N° d'ordre : 327

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis MONJOUR

Recherches sur l'intoxication alimentaire du Caneton et du Rat par *Aspergillus flavus*.

(Aspect histologique. immunologique et biochimique)

Soutenue le octobre 1971, devant la Commission d'Examen :

MM. R. CAMBAR, Professeur ..... *Président.*

P. CREAC'H, Professeur .....

M^lle H. DUTRIEU, Professeur ..... *Examinateurs.*

M. M. GENTILINI, Maître de Conférences agrégé à l'Université de Paris (C.H.U. : Pitié-Salpêtrière) .....

— 1971 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543509_0014

N° d'ordre : 327

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Louis MONJOUR

Recherches sur l'intoxication alimentaire du Caneton et du Rat par *Aspergillus flavus*.

(Aspect histologique. immunologique et biochimique)

Soutenue le octobre 1971, devant la Commission d'Examen :

MM.	R. CAMBAR, Professeur	*Président.*
	P. CREAC'H, Professeur	*Examinateurs.*
M^lle	H. DUTRIEU, Professeur	
M.	M. GENTILINI. Maître de Conférences agrégé à l'Université de Paris (C.H.U. : Pitié-Salpêtrière)	

— 1971 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A PIERRETTE

GWENAEL

ERICK

ERWANN

avec tout mon amour

A MES PARENTS

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

Monsieur CAMBAR, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Bien des années après avoir été l'un de ses élèves nous avons retrouvé auprès de notre maître autant de générosité et de cordialité. Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre plus profonde gratitude.

Monsieur CREAC'H, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, a bien voulu diriger ce travail entrepris en Afrique; nous lui devons de l'avoir mené à bien grâce à ses conseils et à ses précieux encouragements - Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos sentiments les plus respectueux et les plus dévoués.

Mademoiselle DUTRIEU, Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, nous a fait le grand honneur de faire partie de ce jury. Nous désirons lui exprimer toute notre reconnaissance d'avoir bien voulu accepter d'être notre juge.

Monsieur GENTILINI, Maître de Conférences Agrégé, Chef de Service à l'Hôpital de la Pitié, nous a toujours encouragé à poursuivre ces recherches. Nous le remercions d'avoir accepté d'être membre de ce jury malgré son éloignement et ses nombreuses activités - Que ce travail soit le témoignage de mon amitié la plus fidèle.

Nous voulons remercier

Monsieur le Pharmacien Colonel Toury , Directeur de l'O.R.A.N.A. Dakar (Sénégal) qui nous a permis de poursuivre une partie de ce travail dans ses laboratoires de recherches.

Monsieur le Docteur Biguet, Professeur Agrégé de Parasitologie à la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lille, dont les conseils nous ont permis la réalisation des techniques immunologiques.

Monsieur le Docteur QUENUM, Professeur Agrégé d'Anatomo-pathologie à la Faculté de Médecine de Dakar (Sénégal) - qui nous a fait bénéficier de ses conseils et de son aide au cours de nos études anatomo-pathologiques.

Monsieur le Docteur URIEL, Chef du Service de Chimie des protéines - Institut de Recherches sur le cancer - Villejuif - qui nous a fourni de nombreux produits biologiques indispensables à la poursuite de nos études immunologiques.

Monsieur le Docteur FRAYSSINET, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a bien voulu nous faire part de ses recherches biochimiques concernant l'acitivté des aflatoxines.

Le service de Biochimie de l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal) et plus particulièrement le Pharmacien commandant J.L. OUDART.

Madame MARIAGE, Licenciée ès Sciences, qui a été notre collaboratrice pendant plus de deux ans.

Les membres du Secrétariat du Service de Parasitologie et de Médecine Tropicale (Professeur Agrégé M. GENTILINI - U.E.R. PITIE-SALPETRIERE) qui nous ont aidé tout au long de la préparation de ce mémoire.

RECHERCHES SUR L'INTOXICATION ALIMENTAIRE DU CANETON ET DU RAT

PAR ASPERGILLUS FLAVUS

ASPECTS HISTOLOGIQUE, IMMUNOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1 - 2
PREMIERE PARTIE : CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES AFLATOXINES	
Chap. I - Historique et résultats antérieurs	3 - 19
- Historique	3 - 5
- Résultats antérieurs	5 - 19
DEUXIEME PARTIE : METHODES D'INVESTIGATION POUR L'ETUDE D'ASPERGILLUS FLAVUS ET SA TOXICITE	
Chap.II - L'agent pathogène et sa toxine	20 - 31
A) Origine et identification des souches expérimentales	20 - 24
B) Recherche, caractérisation et dosage des aflatoxines	25 - 31
1 - dans les cultures aspergillaires	25 - 29
2 - dans les aliments souillés par les aspergillus	29
3 - dans les produits biologiques et les organes des animaux intoxiqués	29 - 31
Chap.III- Evaluation de l'activité biologique des aflatoxines par des techniques biologiques, histologiques, immunochimiques et biochimiques	32 - 64
I - Activités biologiques des aflatoxines	32 - 36
II - Modifications histologiques produites par les aflatoxines	36
III - Modifications de l'état immunologique des animaux agressés par les aflatoxines	36 - 56
IV - Contrôle biochimique de l'activité des aflatoxines	56 - 64

Pages

TROISIEME PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Chap. IV - Toxicité comparée de différents champignons microscopiques. Contamination de diverses denrées alimentaires végétales par Aspergillus flavus 65 - 75

I - Toxicité comparée de différents champignons microscopiques 65 - 70

II - Contamination de diverses denrées alimentaires végétales par Aspergillus flavus 71 - 73

Chap. V - Métabolisme des aflatoxines - Interprétation des résultats expérimentaux 74 - 78

I - Résultats - Métabolisme des aflatoxines 75 - 77

II - Recherche de l'aflatoxine 77

III - Interprétation et discussion 77 - 78

Chap. VI - Lésions parenchymateuses et altérations staturo-pondérales des canetons et des rats provoquées par les aflatoxines 79 - 98

I - Lésions parenchymateuses et altérations staturo-pondérales des canetons 80 - 89

II - Lésions parenchymateuses et altérations staturo-pondérales des rats 90 - 98

Chap.VII - Application des réactions d'hémagglutination-inhibition à l'étude des nécroses hépatiques provoquées par les aflatoxines 99 - 111

I - Méthodes d'investigation et résultats 100 - 107

II - Discussion des résultats de l'expérimentation 107 - 111

Pages

Chap. VIII - L'influence de l'aflatoxine dans la synthèse protéique du rat 112 - 162
I - Apparition des amaigrissements 113 - 117
II - Bilans azotés 117 - 119
III - Modifications sanguines 119 - 121
IV - Excrétion de la créatine et de l'urée 122
V - Lésions du tractus digestif 122 - 123
VI - Rôle éventuel des glandes endocrines 123 - 124
VII - Comportement immunologique 124 - 158
VIII - Observations biochimiques 158 - 162

Chap. IX - Biosynthèse des cétostéroïdes sous l'effet de l'intoxication par les aflatoxines 163 - 168
I - Résultats des expérimentations 164 - 165
II - Hypothèse et discussion 165 - 168

Résumé et conclusions 169 - 175

Bibliographie 176 - 197

INTRODUCTION

- A l'époque où les organismes sociaux - économiques s'inquiètent de la toxicité des pollutions, il faut rappeler l'agressivité parfois exceptionnelle de certains contaminants fongiques banaux vis à vis de l'homme ou des animaux.

- Cette notion est récente ; au début du siècle, seuls les champignons macroscopiques, qui élaborent des toxines pathogènes, sont considérés comme dangereux. Amanita phalloïdes et ses deux satellites - Amanita virosa et verna - constituent les principaux champignons mortels des régions boréales et méditerranéennes.

- Amanita muscaria et Amanita panthérina sont moins redoutables ; leurs métabolites toxiques à tropisme nerveux central et périphérique, déterminent des troubles graves, le plus souvent réversibles, rarement mortels.

- Les toxines de ces amanites dont les formules chimiques sont bien élucidées : phaline, amanitine, phalloïdine, (A. phalloïdes), muscaridine, muscarine (A. muscaria) sont léthales.

- Cependant, la majorité des champignons macroscopiques, c'est à dire ceux qualifiés de vénéneux : Inocybes, Clitocybes, Panaéolus, Gyromitres, ne provoquent qu'un syndrôme sudorien ou narcotinien éphénère ou encore une intoxication par mécanisme anaphylactique. Les troubles et les lésions organiques dont ils sont responsables sont rarement irréversibles.

Le nombre des champignons macroscopiques pathogènes se trouve relativement limité ; leur incidence est mineure sur la vie économique des pays où ils prolifèrent.

Les champignons microscopiques, vulgairement appelés moisissures, susceptibles d'élaborer des mycotoxines, sont pour la plupart des Ascomycètes. Les Phycomycètes n'élaborent pas de toxines agressives.

Une trentaine d'espèces de moisissures, contaminants banaux des végétaux comestibles, sont pathogènes pour l'homme et l'animal. Ce sont des agents de pollution remarquablement actifs. Non seulement ils dégradent la structure des aliments et dévalorisent leur potentiel biologique en abaissant considérablement leur teneur en vitamines, mais encore les mycotoxines qu'ils élaborent provoquent l'altération staturo-pondérale des animaux d'élevage et simultanément des hécatombes brutales.

C'est ainsi qu'un champignon Ascomycète, Aspergillus flavus, peut sécréter des substances antimicrobiennes thérapeutiques (antibiotiques) ou engendrer des toxines léthales (aflatoxines) capables d'entraîner une "multicancérisation" tissulaire chez certains ordres de Vertébrés particulièrement sensibles à cette agression. Ses diverses propriétés déjà connues en font un matériel expérimental de premier choix dans l'étude de l'action biologique des toxicités fongiques et nous aurons l'occasion d'en présenter de nombreux aspects inédits au cours de cet exposé.

- PREMIERE PARTIE -

CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES AFLATOXINES

CHAPITRE I

HISTORIQUE ET RESULTATS ANTERIEURS

HISTORIQUE :

-Ninard et Hinterman (133), en 1944 au Maroc, signalent le décès de nombreux porcs qui ingèrent des tourteaux toxiques de karité, de coton et d'arachide. Des lésions hépatiques graves : atrophie jaune aïgue du foie et hépatomes malins, sont décelées à l'autopsie.

-Aubertin et Coll (16) décrivent, à la même époque, les accidents hépatiques mortels du chien consommateur de tourteau d'arachide.

-En Angleterre, de spectaculaires épizooties massives d'étiologie indéterminée, dénommées "maladie X", étranges de par leurs symptômes, anormales de par leur brutale expansion, déciment en 1960, la majorité des élevages de dindons (44).

-Cette maladie, d'abord attribuée à des toxines microbiennes, puis à un virus, est rapportée enfin, en désespoir de cause, à la toxicité des constituants du régime alimentaire.

-Divers aliments composés furent incriminés. Il fallut cependant reconnaître qu'ils ne comportaient pas de graines toxiques : ricin (ricine), coton (gossypol) ou Senecio (42) dont on sait les alcaloïdes, et surtout la pyrrolizidine, mortels (32, 158).

-L'enquête permit enfin de déceler le dénominateur commun responsable de cette hécatombe, en l'occurrence l'arachide.

-Selon leur provenance, les tourteaux d'arachide étaient plus ou moins nocifs. - Ceux du Brésil (5, 10, 103) intoxiquaient la volaille qui

ingérait sans troubles apparents les farines d'arachide de l'Inde.

- Une substance étrangère contaminant les tourteaux brésiliens pouvait donc être mise en cause.

- Les investigations s'orientèrent vers les moisissures banales fructifiant sur les végétaux comestibles.

- Certains Pénicilliums toxiques : P. citrium, P. variable, P. fréquentatus, P. rubrum (195), P. pubérulum (87, 197), furent suspectés, mais plus encore P. islandicum.

- La lutéoskyrine (68, 175, 188) toxine de cette moisissure, provoque en effet la cancérisation expérimentale du foie des animaux supérieurs des lésions d'hépatite aïgue nécrosante, une cirrhose hépatique mortelle. Il s'avéra cependant qu'elle n'était point à l'origine des intoxications en cause.

- En 1961, la découverte dans la famille des Aspergillacées du contaminant responsable des accidents mortels mettait un terme aux recherches étiologiques.

- Les chercheurs du T.P.I.* et du C.R.A. de Weybridge ** avaient suspecté A. citrinum, A. restrictus et A. terreus (59) qui recélent pourtant des facteurs de croissance pour les oiseaux ; puis A. fumigatus (43), A. parasiticus (87), A. clavatus (69, 127) et A. ochraceus (116, 117, 164) qui synthétise trois composés toxiques. Ils isolaient enfin, le microorganisme agent de la maladie "X" du dindon : Aspergillus flavus.

* T.P.I. : Tropical Products Institute.

** C.R.A. de Weybridge : Centre de Recherches Agronomiques de Weybridge.

Certaines souches d'Aspergillus flavus élaborent un puissant toxique. Les premiers, Sargeant, O'Kelly, Carnaghan et Allcroft réussirent à l'extraire. Ils lui donnèrent le nom d'Aflatoxine (155) et commencèrent son étude.

Immédiatement, l'Aflatoxine se révèle cancérigène ; elle est mille fois plus active que le cancérigène hépatique le plus agressif.

Dès lors, la Presse (notamment le Daily Telegraph, dans un article en date de mai 1964) commente les accidents mortels des collectivités animales, liés à l'ingestion de contaminants aspergillaires toxiques.

Plus de 1.200 publications traiteront en une décennie des propriétés physico - chimiques, toxiques et cancérigènes de l'Aflatoxine, ou plutôt des aflatoxines, encore dénommées flavotoxines.

Rapidement en effet, il s'avéra que le composé, isolé par Sargeant et Coll, était un mélange de molécules présentant des formules assez voisines les unes des autres.

RESULTATS ANTERIEURS :

Aspergillus flavus appartient à la classe des Ascomycètes, groupe des Plectomycètes, ordre des Plectascales, famille des Aspergillacées.

La souche classique utilisée élabore en très grande quantité des aflatoxines très toxiques.

Il s'agit d'Aspergillus flavus, souche Link (106) ex Fries, antérieurement connue sous le nom d'Eurotium Aspergillus flavus de de Barry et Woronin (24) dont il existe 12 synonymes probables (143).

Cette souche prolifère et fructifie abondamment là où elle trouve une humidité relative satisfaisante : 85 à 90 %, une température idéale : 30 à 35°C (18, 61). Ces conditions se rencontrent notamment dans les sols tropicaux à la saison des pluies (176). Ainsi se constitue une sorte de "réserve cryptoganique" dont les éléments vont polluer les récoltes et les denrées alimentaires végétales stockées dans des conditions précaires.

Entre 13°C et 41°C, la souche aspergillaire élabore des toxines pathogènes. Elle se développe sans manifester de toxicité en deçà et au delà de ces limites de températures (61).

La concentration en aflatoxines des divers végétaux pollués dépend non seulement de la température mais aussi de la durée de l'incubation.

TABLEAU I : Concentration de l'arachide en aflatoxines (µg %) en fonction de la température et de la durée de l'incubation (d'après Diéner et Davis)(60).

Durée (jours)	Température	Aflatoxine B1	Aflatoxine G1	Total "B1 + G1"	Rapport "B1 / G1"
9	20°C	45	400	445	0,11
	30°C	1840	3200	5040	0,57
21	20°C	460	4000	4460	0,11
	30°C	5750	10000	15750	0,57

Il arrive cependant que certains végétaux fortement contaminés par une pollution aspergillaire, développée en des conditions apparemment favorables, ne soient pas toxiques (62, 63). Il n'existe donc pas de relation obligatoire entre la densité du contaminant et son pouvoir agressif (64).

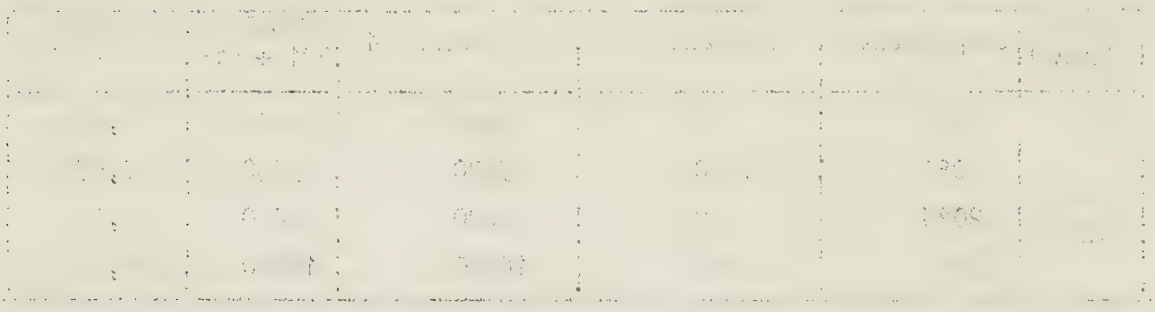
Il suffit enfin de quelques graines polluées par des souillures aspergillaires très toxiques pour rendre dangereuse la consommation de tout un lot d'arachide (54, 182).

- On a pu extraire des milieux de culture d'Aspergillus flavus de très nombreux composés fluorescents en lumière ultraviolette.

Parmi les 12 spots fluorescents dénombrés sur un chromatogramme par Smith et Mc Kernan, 5 correspondent certainement à des aflatoxines ; les autres sont déterminés par des impuretés non dangereuses (162).

- La fluorescence n'est donc pas un critère absolu de toxicité (182).

- Parmi les composants de l'aflatoxine brute, les chercheurs du T.P.I. (180) ont isolé, par chromatographie descendante sur papier, en présence d'un



éluant complexe : benzène - toluène - hexane-méthanol - eau (3 : 3 : 5 : 8 : 5), un ensemble de molécules de constitution plus ou moins voisine pour lesquelles ils conservèrent la dénomination d'Aflatoxine, affectée d'un symbole alphabétique et numérique.

Ces molécules peuvent être rassemblées en trois grandes familles, les Aflatoxines B et G auxquelles vint ultérieurement s'ajouter la famille M.

Tous les composés de chacune de ces familles possèdent un Rf caractéristique dont voici quelques exemples :

TABLEAU II : Rf de diverses Aflatoxines

Aflatoxines	Rf
B 1	0,56
B 2	0,53
G 1	0,48
G 2	0,46
M	0,20

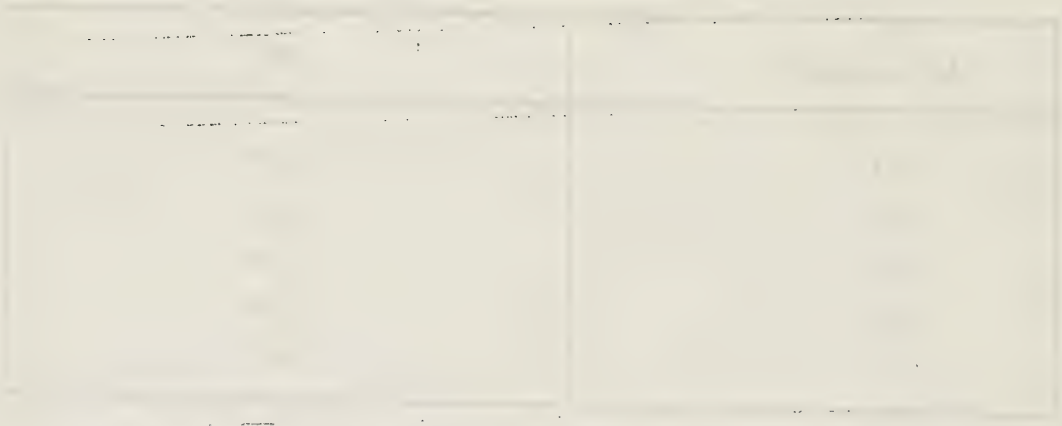
Ce sont surtout les Aflatoxines B 1 et B 2 qui contaminent les provendes et les tourteaux commerciaux.

Les substances de la série G (G1 et G2) sont extraites de cultures en milieux synthétiques.

Les dérivés B2 a, G2 a, M1, M2 sont considérés comme des produits de la dégradation des précédents. Ils polluent les cultures aspergillaires quiescentes, le lait et les urines des ruminants.

- Sous l'effet du rayonnement U.V., les substances de type "B" (B1-B2) ainsi que l'Aflatoxine M1, émettent une lumière fluorescente bleue (B = blue)

- Les produits de la série "G" et l'Aflatoxine M2 émettent une lumière fluorescente verte (G = green).



Carnaghan, Hartley et Coll (45) ont mesuré l'intensité de la fluorescence des diverses flavotoxines.

TABLEAU: Intensité de la fluorescence des principales aflatoxines.

N° III

Aflatoxines	Intensité de la fluorescence.
Aflatoxine B I	0,5
Aflatoxine B 2	4,0
Aflatoxine G I	2,5
Aflatoxine G 2	6,5

Le pouvoir fluorescent des composés purs croit en raison inverse de leur toxicité (I82). Mais s'il s'agit de produits extraits de tourteaux souillés par les aflatoxines, les caractéristiques précédentes ne sont plus aussi nettement appréciables (45).

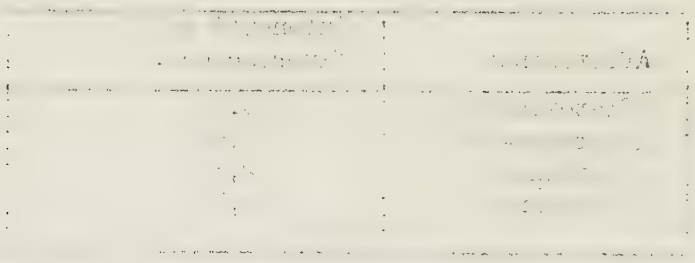
La toxicité de la molécule d'aflatoxine dépend de sa structure moléculaire (53). Si l'indice numérique des aflatoxines est 1 (B I ; G I) leur premier noyau (furfurol) comporte une double liaison; cette double liaison est saturée dans le groupe des aflatoxines portant l'indice 2 (B 2. G 2).

La toxicité de la molécule d'aflatoxine dépend du degré d'hydrogènation du noyau furfurol mais aussi de la structure du dernier noyau.

Le dernier noyau des Aflatoxines G. comporte 6 atomes de carbone et une lactone; il ne comporte que 5 atomes de carbone chez les Aflatoxines B.

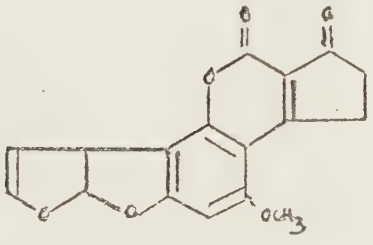
On sait que l'hydrogènation du noyau furfurol et la formation d'une lactone sur le noyau terminal diminuent la toxicité des flavotoxines (II, 45).

De telles différences de structure expliqueraient que l'Aflatoxine B I soit trois fois plus toxique que l'Aflatoxine G 1 (45).

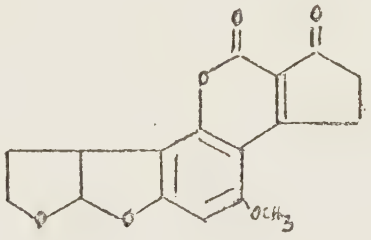


LES PRINCIPALES AFLATOXINES :

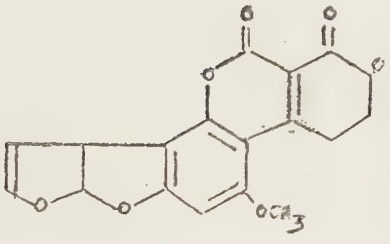
Leurs formules ont été établies au cours des travaux de nombreuses équipes, notamment Asao et Coll (11) Sargeant et Coll (156) Van Dorp et Coll (65) Adye et Coll (4).



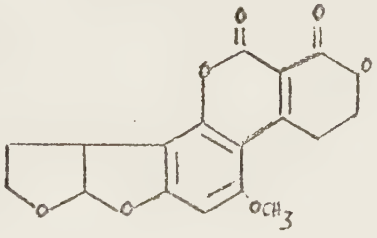
Aflatoxine B_1



Dihydro-aflatoxine B
(Aflatoxine B_2)

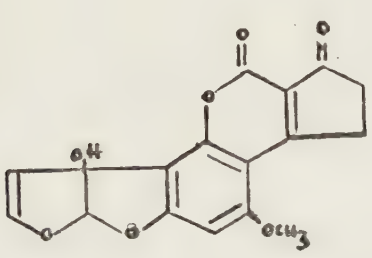


Aflatoxine G_1

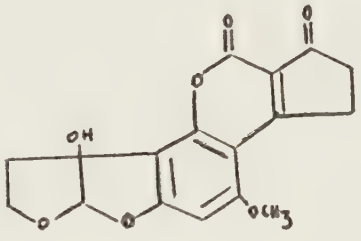


Dihydro-aflatoxine G
(Aflatoxine G_2)

Les aflatoxines M, dérivés hydroxylés du métabolisme des aflatoxines B, sont présentes dans l'urine et le lait des mammifères (7, 8, 91, 94).



Aflatoxine M_1



Aflatoxine M_2

Les formules chimiques de ces toxines aspergillaires ne comportent point de groupements azotés et ne sont donc pas de nature alcaloïdique. Leur fonction lactone et leur structure les apparentent aux antibiotiques, mais elles n'en présentent pas les propriétés.

Les caractéristiques physicochimiques des flavotoxines sont résumées et colligées dans le tableau suivant (selon Hartley (82)).

TABLEAU IV.

	AFLATOXINE B1	AFLATOXINE B2	AFLATOXINE G1	AFLATOXINE G2
Formule	$C_{17}H_{12}O_6$	$C_{17}H_{14}O_6$	$C_{17}H_{12}O_7$	$C_{17}H_{14}O_7$
Masse moléculaire	312	314	328	330
Point de fusion (°C)	265-270	305 - 309	247 - 250	237 - 240
Spectre d'absorption dans l'U.V. λ éthanol max.(mμ)	223,265,263	222,265,362	243,257,264 et 362	

- Les aflatoxines sont solubles dans les solvants organiques, tels le chloroforme, le propyléneglycol, l'éthanol, le méthanol, la diméthyl formamide.

- La solubilité différente des divers composés dans le chloroforme permet de les isoler. Les substances de type B et les substances de type G sont séparées par 200 passages à contre - courant dans un mélange chloroforme - tétrachlorure de carbone - eau - méthanol.

- Une recristallisation dans le méthanol permet de recueillir les aflatoxines B. Ces toxines sont parfois instables en solution méthanolique. Elles cristallisent en aiguilles jaunes ou en aiguilles incolores quand leur purification est complète.

- Les aflatoxines sont insolubles dans l'éther de pétrole et les hydrocarbures saturés. Elles ne sont donc pas entraînées au cours de l'extraction industrielle de l'huile d'arachide et demeurent dans les tourteaux qui conservent leur toxicité.

- Les aflatoxines peu solubles dans les triglycérides le sont particulièrement dans les monoglycérides, les diglycérides et les savons.

- Elles parviennent ainsi à polluer certaines huiles de pression qui, éventuellement ajoutées aux aliments composés, peuvent provoquer des accidents léthaux dans les élevages.

- Ces substances pathogènes sont photosensibles, relativement thermorésistantes jusqu'à 250° C, mais s'altèrent rapidement en milieu alcalin.

- Si les propriétés chimiques des aflatoxines furent rapidement connues, leurs propriétés biologiques ne sont pas encore toutes décelées.

- Les toxicoses survenues dans les élevages de volailles furent reproduites dans les Centres expérimentaux.

- Ainsi se trouvèrent vérifiés la toxicité et le pouvoir cancérigène des aflatoxines.

- Avant de préciser leur mécanisme d'action biochimique, les études demeurèrent longtemps descriptives.

- Plus de 300 publications signalent l'action pathogène des toxines aspergillaires chez les animaux expérimentaux. Elles déterminent :

A/ - Des intoxications aïgues, notamment chez :

- LES OISEAUX :

- l'intoxication aïgue est provoquée par une ingestion massive d'aflatoxines (131, 151).

- Les sujets jeunes, particulièrement susceptibles, meurent d'autant plus rapidement qu'ils sont précocement soumis à l'action de l'aflatoxine (72).

- C'est ainsi que le taux de mortalité est de 100 % pour un lot de jeunes canetons intoxiqués dès la naissance; il n'est plus que de 25 % dans une série de palmipèdes traités à l'âge de 5 jours.

- A l'intérieur d'une même espèce, certaines races sont plus résistantes : le caneton White Pennines réagit moins intensément au toxique que le caneton Kaki Campbell (29).

- La dose d'aflatoxines entraînant la mortalité de 50 % des individus d'un lot expérimental est de l'ordre de 0,5 mg par kilogramme de poids vif.

- Pour le caneton de 1 jour (poids : 50 g), la DL 50 dépend essentiellement du type d'aflatoxine testée.

- Elle est respectivement de 18,85,39,172 µg pour les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (45).

- Initialement décrites par Carnaghan et Coll. (45) Newberne et Coll. (131) et bien d'autres auteurs, les lésions les plus caractéristiques consistent en proliférations cellulaires basophiles disséminées dans le parenchyme hépatique et localisées autour des espaces portes, accompagnées ou non de nécrose hépatique.

- Au cours du présent travail il nous sera donné de préciser la chronologie d'apparition des lésions, leur structure histologique, leur rapidité d'expansion.

La résistance des poussins à l'intoxication par les aflatoxines varie considérablement d'une souche génétique à l'autre. Certains ne supportent pas une dose qui ne provoque chez d'autres que des manifestations bénignes.

Les poulets présentent de rares accidents mortels au cours de l'intoxication. Leurs fréquentes lésions parenchymateuses hépatiques consistent en nécrose centrolobulaire , prolifération en cordons cellulaires basophiles de l'épithélium des canalicules biliaires, fibrose périlobulaire tardive à partir du troisième mois d' agression. (10, 15, 72).

- L'injection d'aflatoxine dans un oeuf embryonné provoque : l'altération de sa membrane chorio-allantoïdienne et dès le 19ème jour d'intoxication une hypotrophie très caractéristique de l'embryon (141, 189).

Les dindons sont rapidement intoxiqués (28, 171, 174, 191). Rappelons à nouveau, qu'en Grande Bretagne, plus de 100 .000 dindons moururent brusquement en 1960 après avoir ingéré des farines de tourteaux contaminés par Aspergillus flavus (44).

LES POISSONS :

Une épizootie mortelle apparaît en 1961 dans un élevage de truites de l'Idaho. Elle est attribuée aux concentrés alimentaires largement utilisés en pisciculture. Un examen plus approfondi montre que ces concentrés renferment des tourteaux de coton pollués par des aflatoxines léthales (13, 14, 79, 80, 198, 200).

L'agressivité des toxines aspergillaires sur les espèces piscicoles et les poissons en général est encore mal élucidée.

LES MAMMIFERES :

Monogastriques et polygastriques constituent des lésions caractéristiques au cours des intoxications aïgues.

1/ Mammifères monogastriques :

- Le porcelet : après inappétence initiale et altération staturo-pondérale, l'animal meurt soit d'hépatite soit de cirrhose, soit de cachexie (81). Une tuméfaction rénale concomittante est souvent associée aux lé-

sions (108).

LE CHIEN :

Les quelques expériences réalisées rendent compte de l'important amaigrissement de l'animal et de l'apparition de lésions hépatiques caractéristiques : foie stéatosique, hyperplasie des canalicules biliaires, nécrose parenchymateuse parcellaire (16, 132).

LE RAT :

Les symptômes d'intoxication aïgue du rat sont signalés dès 1960 par Le Breton et Coll (105).

La DL 50 dépend du mode d'administration du toxique et du sexe de l'animal (33).

La DL 50 pour les rats mâles intoxiqués par voie intrapéritonéale est de 6 mg d'aflatoxines / kilogramme de poids vif ; elle est de 7 mg / kilogramme quand les animaux ingèrent un régime contaminé par les toxines aspergillaires brutes (33).

Les rattes sont plus résistantes à l'agression ; la DL 50 par voie intrapéritonéale est de 18 mg / kg. (33)

Rappelons que les doses léthales 50 du caneton sont de 0,5 mg d'aflatoxines par kilo de poids ; le jeune rat mâle paraît donc dix à vingt fois moins sensible aux aflatoxines que le jeune palmipède (46).

- Les altérations staturopondérales et les lésions parenchymateuses consécutives à l'intoxication aïgue :

. D'après Lancaster et Coll (104) et Barnes et Coll (23) notamment, les rats maigrissent ; les lésions hépatiques, consécutives à l'admi-

nistration parentérale d'aflatoxines purifiées, sont fréquentes : zone de nécrose périportale, prolifération précoce de cellules biliaires, architecture hépatique perturbée par l'apparition tardive de tissus fibreux disséquant les lobules.

Ces lésions comportent une chronologie d'apparition bien précise.

Nos travaux sur l'intoxication des rongeurs par les aflatoxines confirment le retard de croissance et la diversité de ces altérations parenchymateuses microscopiques. Le rat meurt d'autant plus rapidement que la contamination du tourteau ingéré est importante et que son taux d'aflatoxines est considérable.

LA SOURIS :

Une intoxication aïgue, consécutive à l'ingestion d'extraits d'Aspergillus flavus, provoque une mortalité élevée dans les élevages.

Les souris succombent parfois de troubles neurologiques : tremblements intermittents, convulsions, crises téta/niques qui surviennent rapidement après l'ingestion d'extraits aspergillaires (196).

L'agressivité de ces neurotoxines fongiques dépendrait des milieux et des conditions de culture.

LES RONGEURS SAUVAGES :

Des régimes à 300 ppm d'aflatoxines provoquent la mort rapide des rongeurs sauvages sélectionnés pour nos expérimentations : rats palmistes (Xérus ery/thropus), gerbilles du genre Tatera, musaraignes (Crocidura sp), Arvican/this sp. et Cricetomys gambianus Waterhouse (rat de Gambie).

LE COBAYE :

Les lésions consécutives à l'intoxication aïgue par les aflatoxines rappellent les altérations parenchymateuses - pulmonaires, hépatiques, rénales - décelées à l'autopsie des rats (35).

La dose léthale 50 d'aflatoxines, per os, est de 1,4 mg/kg de poids pour le cobaye mâle.

LE SINGE :

L'ensemble des travaux concernent l'intoxication chronique des singes : Cynocéphales, Rhésus, etc...

Sroboda et Coll (173) font remarquer cependant que la nécrose hépatique du primate au cours de l'intoxication aïgue est centrolobulaire.

MAMMIFERES POLYGASTRIQUES :

- Les ruminants :

. Des accidents d'intoxication aïgue sont recensés dans les élevages de jeune bétail (41, 76).

Le veau qui ingère le lait toxique d'une mère consommant des tourteaux très pollués par les aflatoxines, décède rapidement (6).

Les ruminants adultes résistent mieux à l'intoxication, mais certains supportent mal les extraits aspergillaires contenus dans leur ration et dépérissent (41, 50, 108).

B/ - Des intoxications chroniques et la cancérisation :

Les effets pathologiques qui vont être évoqués sont provoqués soit par les régimes alimentaires qui comportent des doses infimes, mais constamment répétées d'aflatoxines, soit par des injections renouvelées de flavotoxines.

Dans ces conditions d'intoxication à long terme, les aflatoxines manifestent aussi un grand pouvoir cancérigène pour certaines espèces zoologiques.

Le protocole de cancérisation expérimentale (- dose - voiesd'introduction - latence du développement tumoral -) est désormais bien connu.

Le foie des vertébrés est le parenchyme le plus agressé, notamment chez :

a) - Les oiseaux :

De données éparses (151) il apparaît que le caneton présente au cours de l'intoxication chronique des lésions hépatiques : une néocanalogénèse marquée, des infarctus artériels, une congestion vasculaire du foie (111).

Les lésions hépatiques du poulet - dans de semblables conditions expérimentales - sont analogues. Associés aux symptômes hémorragiques et exsudatifs, des lésions de nécrose centrolobulaire, des proliférations en cordons cellulaires basophiles de l'épithélium des canalicules biliaires, parsèment le parenchyme.

Au quatrième mois apparaissent des nodules de régénération, un envahissement du tissu hépatique par des cellules lymphoïdes, une fibrose périlobulaire (22).

Ces lésions tardives ne sont pas courantes chez le jeune caneton intoxiqué qui meurt avant de les constituer.

Les manifestation hépatocancéreuses des oiseaux provoquées par les aflatoxines sont décrites également par Carnaghan (46).

b) - Les poissons :

L'intoxication chronique des salmonidés détermine l'apparition d'hépatomes (12, 13, 14, 79, 80, 154).

Dès l'après guerre, ces tumeurs furent attribuées au pétrole, aux huiles minérales et aux goudrons (92), aux hydrocarbures aromatiques (40, 192), à l'uréthane (77, 199), aux substances radioactives (98) déversées dans les rivières et les collections aquatiques.

Depuis lors, les aliments composés, utilisés en pisciculture sont considérés comme potentiellement cancérigènes lorsqu'ils comportent des tourteaux contaminés par les aflatoxines.

c) Les Mammifères :

1) Mammifères monogastriques :

- Le porc : les lésions du porc adulte soumis à l'intoxication chronique sont répertoriées. Il s'agit de nécrose cellulaire hépatique et d'ascite concomitante, d'ictère généralisé (107, 147, 148).

. Les troubles rénaux sont fréquents.

. Le syndrome hématologique essentiel est la permanence d'une anémie.

. Un faisceau de conjonctures, fondées partiellement sur les expériences princeps de Ninard et Hinterman (133) pressentait l'action cancérigène hépatique des aflatoxines pour le porc. Des expériences récentes (152) confirment ces suppositions.

- Le rat : les essais expérimentaux montrent qu'une dose journalière de 5 à 20 µg d'aflatoxines pendant une année peut provoquer l'apparition d'un hépatome (70).

S'il consomme une ration contenant 20 % de tourteau d'arachide contaminé par Aspergillus flavus, le rat maigrit. Les hépatocarcinomes éventuels sont alors décelés au troisième quadrimestre d'ingestion toxique (104).

Certains régimes supplémentés par des farines d'arachide souillées d'aflatoxines, ont été responsables de l'apparition rapide de tumeurs hépatiques chez le rat au 9ème mois d'intoxication (105).

Butler et Barnes (36) observent des hépatomes chez les rats qui reçoivent successivement, pendant 89 jours un régime à 1,75 ppm d'aflatoxines, puis pendant 300 jours un régime commercial atoxique.

- Le seuil proposé : consommation totale de 0,5 mg d'aflatoxines pour induire le cancer du foie n'est pas reconnu par tous (104).

Selon Barnes et Butler (23) une injection de 2, 50 mg est nécessaire pour induire la tumeur néoplasique.

Frayssinet et Lafont font apparaitre un cancer hépatique chez des rats, qui, ingèrent globalement moins de 0,5 mg d'aflatoxines (71).

La majorité des rats, qui consomment des doses quotidiennes de 5 à 20 µg d'aflatoxines pendant un an, constitue des hépatomes (70).

- Le singe : Comme dans le cas d'une intoxication aigue, l'intoxication chronique conduit à des lésions hépatiques. L'évolution néoplasique des lésions est encore discutée (123).

2) Mammifères polygastriques :

- Les ruminants : La résistance des ruminants à l'intoxication chronique est remarquable. Il est possible que la flore de leur panse remanie les aflatoxines ingérées pour les rendre moins toxiques (1).

L'absence de lésions malignes chez le ruminant pourrait résulter de cette détoxication.

Tout ce qui vient d'être évoqué confirme la toxicité exceptionnelle des aflatoxines.

Il nous reste maintenant à repertorier les produits vivriers altérés par Aspergillus flavus, à préciser le métabolisme des aflatoxines dans l'organisme des animaux - tests, à déterminer leurs activités pathogènes dans la cellule vivante.

Les résultats de cette triple enquête réalisée à l'aide de techniques biochimiques et immunochimiques récentes feront l'objet des chapitres suivants.

- DEUXIEME PARTIE -

METHODES D'INVESTIGATIONS POUR L'ETUDE D'ASPERGILLUS FLAVUS ET SA TOXICITE

CHAPITRE II

L'AGENT PATHOGENE ET SA TOXINE.

A/ - Origine et identification des souches expérimentales :

= Elles sont prélevées :

- soit sur des produits vivriers tropicaux, notamment les graines d'arachide stockées d'une manière archaïque dans les greniers et les cases, ou à l'air libre, en tas dénommés " seccos ".

- soit sur des tourteaux et des farines d'arachide conservés dans des entrepôts mal clos où prolifèrent des aspergillus toxiques.

= Les échantillons utilisés comportent des graines dont les coques ont été brisées accidentellement ou rongées par les termites, ce qui facilite et rend plus dense la contamination aspergillaire (62).

.La décortication permet de dégager les graines contaminées dont le spermoderme souvent déchiré est parfois brun - noirâtre. Les cotylédons et l'embryon présentant une coloration jaune - verdâtre sont toujours infectés, mais on peut rencontrer des tissus contaminés dont la couleur n'a pas subi de modification.

.Les prélèvements en vue des cultures s'effectuent sur les graines non décortiquées, moisies, recouvertes d'un feutrage jaune - verdâtre.

.Les graines enveloppées d'un feutrage noir sont rejetées car elles sont en général souillées de mycéliums provenant d'espèces peu toxiques comme Botriodiplodia théobromae, Macrophomina phaséoli, Aspergillus niger, etc...

. En ce qui concerne les tourteaux et les farines d'arachide, on commence par prélever dans la masse le matériel inclus dans les zones présentant macroscopiquement une nette contamination aspergillaire. Les ensemencements se font à partir de ce matériel.

Les tourteaux et les farines souillés d'aspergillus se reconnaissent facilement. Ils sont parsemés de taches denses caractéristiques, jaune verdâtre ou brune.

- Observation microscopique du matériel contaminé :

En général, le mycélium aspergillaire s'introduit entre les cellules profondes de la graine. Il développe des sclérotes dans la couche sous-tégumentaire (18).

De minces lamelles de cotylédons recouvertes de Teepol à 10 % sont chauffées 2 heures au bain marie puis écrasées entre lame et lamelle dans une goutte de potasse à 20 % (19).

- L'examen microscopique à l'état frais, met en évidence des hyphes caractéristiques - septés ou non - dans le tissu végétal.

- Les échantillons de farines et de tourteaux suspects, lavés sous agitation dans l'eau distillée pendant 10 minutes, sont essorés puis déposés sur papier filtre. Après séchage la poudre, examinée à la loupe binoculaire, peut recéler des proliférations brunes, verdâtres et oranges annonciatrices de la présence probable d'Aspergillus flavus.

Observées au microscope - après écrasement entre lame et lamelle dans une goutte de potasse à 10 %, - ces proliférations révèlent la présence d'hyphes caractéristiques mélangés à des cellules d'arachide.

Généralement, les solutions colorantes ou contrastantes ne sont pas indispensables pour la mise en évidence des conidiophores, des conidies et des hyphes (142) Cependant le bleu coton, l'éosine et tout autre colorant d'aniline peuvent être utilisés avec profit pour la différenciation des struc-

tures aspergillaires imprécises.

Examen des cultures :

Le diagnostic de certitude de la nature du parasite est fondé :

- sur l'aspect macroscopique de sa culture en milieux appropriés et sur le contrôle microscopique définitif de son identité.

1°) Les milieux de culture utilisés sont :

- la gélose de Sabouraud
- le milieu de Czapek (55) (Czapek ox agar) adapté par Dox (66) contenant 30 % de sucrose et stérilisé à 120° pendant 20 minutes.
- la solution de Raulin simplifiée par Mosseray (128).
- l'agar malté à 20 °/$_{oo}$, selon la formule de Blakeslee (25) stérilisé ou contenant 20 U. de pénicilline et 40 U. de streptomycine par ml.
- le milieu de Brian liquide *(31). Nous l'avons utilisé avec profit pour la conservation des caractères antigéniques de la souche aspergillaire et le maintien de ses propriétés toxiques.

L'ensemencement du parasite sur milieu de Brian s'effectue à l'öse de platine.

- La grande majorité des cultures aspergillaires prolifèrent de façon satisfaisante et sporulent abondamment entre 23°C et 26°C. Elles ont un aspect velouté ; les nappes jaune - verdâtre correspondent le plus souvent à de très denses proliférations de spores aspergillaires.

2°) Le diagnostic différentiel d'Aspergillus flavus Link à 25°C sur milieu de Czapek, se définit selon les critères proposés par Raper et Fennell (144).

- Colonnes ne virant pas au brun sur milieu de Czapek.
- Têtes conidiales jaune pâle ou jaune foncé ou encore jaune vert en début de développement.

* Milieu de Brian, page 23.

MILIEU DE BRIAN

A un litre de milieu de base, ajouter,
1ml,4 de solution A
1ml,4 de solution B

I°/ MILIEU DE BASE :

Glucose.....	50,0 g
NO3 NH4.....	2,4 g
PO4 H2K.....	10,0 g
SO4 Mg.....	2,0 g
Eau distillée QRS.....	1000,0 ml

2°/ SOLUTION A :

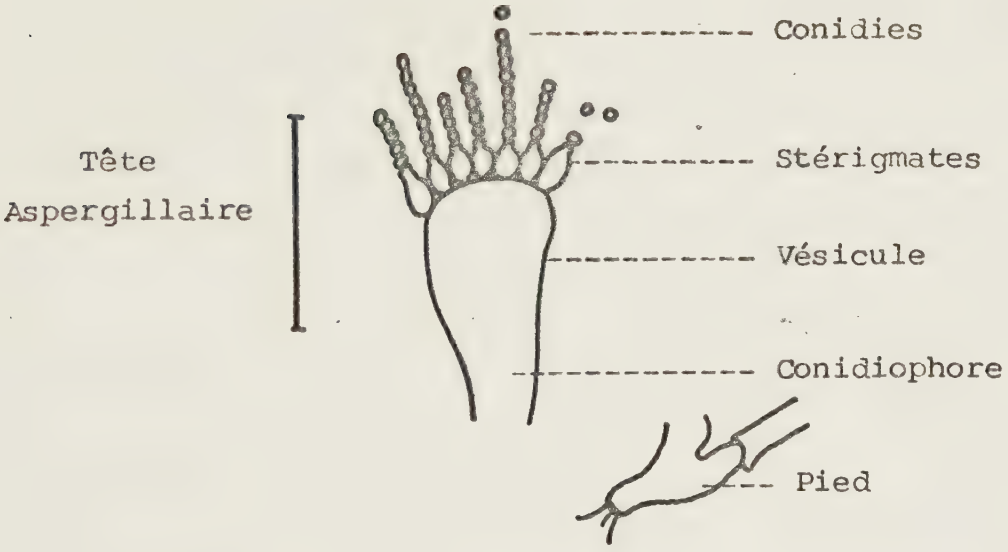
SO4 Zn.....	2,0 g
SO4 Cu.....	0,20 g
NO3/2 Co.....	0,10 g
Eau distillée QRS.....	100,0 ml

3°/ SOLUTION B :

Cl 2Co.....	5,0 g
Eau distillée QRS.....	100,0 ml

- Conidies définitivement échinulées.
- Stérigmates soit simples, soit doubles, le dernier est prédominant ; tête radiée et colonnes de spores peu serrées.

Fructification des Aspergillus



- Cette étude morphologique ne renseigne pas sur la toxicité du parasite inventorié.

- Il apparaît cependant que la sécrétion de toxine est maximale quand les appareils conidiens sont totalement développés (71).

- Etant donné que la toxicité des souches, provenant de lieux au climat dit tempéré, est très limitée, nous nous sommes placés dans des conditions écartant un apport occasionnel de telles souches.

- Bien que tous nos prélèvements aient été effectués en milieu climatique subtropical, nous avons sélectionné les cultures en fonction du seul critère de leur toxicité.

B/ Recherche , caractérisation et dosage des aflatoxines.

1) dans les cultures aspergillaires;

a) Dosages chromatographiques :

Ils permettent l'isolement, la purification, lacaractérisation de la toxine fongique.

Toutes les méthodes contemporaines utilisées pour sa détection sont inspirées des techniques initialement élaborées par le T.P.I. * de LONDRES(179).

Elles comportent les opérations suivantes :

1°) Préparation des extraits concentrés de culture d'Aspergillus flavus:

La technique mise au point au laboratoire comporte :

- une stérilisation de la culture d'un poids p(exprimé en grammes) au four Pasteur à 120°C.

- sa délipidation à l'éther de pétrole pendant 8 heures dans un extracteur de Soxhlet.

- un épuisement au méthanol - toujours dans un extracteur de Soxhlet - pendant 8 heures . On utilise 100 ml de méthanol pour 20 grammes de produit dégraissé.

- le résidu d'extraction est débarrassé de toute trace de méthanol par évaporation sous vide.

- ce résidu est alors mis en suspension dans de l'eau distillée. La suspension est soumise pendant 3 heures à une perfusion chloroformique. Après décantation et filtration, le solvant résiduel est éliminé par chauffage modéré. Le nouveau résidu est mélangé à 100 ml d'une solution éther - méthanol à parties égales ; l'ensemble est transvasé dans une ampoule à décantation. Après agitation,5 ml d'eau sont ajoutés et la phase hydroalcoolique obtenue par décantation - épuisée à 3 reprises par 25 ml d'éther de pétrole - est évaporée à sec. Le résidu sec est dissous dans X ml d'eau ; 1 ml

* T.P.I. = Tropical Products Institute.

de solution correspond alors à $\frac{p}{x}$ g de culture recueillie pour la préparation de l'échantillon toxique.

2°) Dosage de la concentration de l'extrait en aflatoxines

La première méthode de dosage, proposée par le T.P.I. (178) notamment, comportait une chromatographie ascendante sur papier avec un éluant classique butanol - acide acétique - eau (20 : 1 : 19).

Ultérieurement d'autres techniques, plus précises, furent préconisées:

- Une chromatographie descendante sur papier avec le mélange : benzène, toluène, héxane, méthanol, eau (3 : 3 : 5 : 8 : 5)(179).

- Une chromatographie en couche mince sur gel de silice (éluant : chloroforme additionné de 9 % de méthanol) (172).

- Une chromatographie en colonne d'alumine selon la méthode de Sargeant et Coll (156) ou de Petit et Coll (137).

- Nous utilisons les techniques de chromatographie sur couche mince de Kieselgel G. (181) (Merck). Le support est une plaque de verre.

Elles permettent une meilleure résolution des constituants de l'extrait et une plus grande rapidité de manipulation.

Moins sensibles que les techniques de chromatographie sur papier, en phase ascendante, elles offrent plus de commodité pour la recherche rapide des aflatoxines aspergillaires.

Sur les plaques de Kieselgel G., à 3 cm d'une ligne de départ, on dépose simultanément des quantités connues d'une solution titrée d'Aflatoxine B1 et des prises d'essai de 2 à 10 microlitres d'extrait à étudier.

Le liquide chromatographique est un mélange chloroforme - méthanol, (96 : 4).

Du fait de la photosensibilité des aflatoxines, l'opération est conduite dans un local obscur. Après séchage, la révélation du chromatogramme s'effectue rapidement en lumière ultraviolette (3650 A°).

- Il apparaît en général quatre spots fluorescents distincts, caractéristiques des quatre principaux constituants de l'aflatoxine.

- Le spot de l'Aflatoxine B1 - qui s'avère la plus toxique des aflatoxines (41)-présente le rf le plus élevé, celui de l'Aflatoxine B2 est plus faible et sa fluorescence est moins intense (45).

- Les spots des Aflatoxines G (G1 et G2) ont des rf inférieurs aux précédents, ce qui permet de les identifier aisément.

- La confrontation des intensités de fluorescence du spot témoin (B1) et des spots chromatographiques de l'extrait, permet une estimation approchée mais encore satisfaisante de la toxicité.

- L'établissement préliminaire d'abaques facilite grandement l'interprétation immédiate des résultats.

- La fluorescence ainsi décelée ne constitue qu'une présomption de toxicité car certaines impuretés émettent des spots fluorescents à la même longueur d'onde que les aflatoxines (162, 182).

Le dosage spectrophotométrique de la fluorescence (138) fournit des renseignements d'une plus grande précision mais nous ne possédons pas le matériel nécessaire à sa réalisation.

Les précédents résultats doivent être contrôlés par :

b) Les dosages biologiques de la toxicité (157)

- Ils s'effectuent sur des canetons d'un jour, mâles ou femelles, de race Kaki Campbell ou White Kaki.

- Pour obtenir la reproductibilité et la fidélité des résultats, il faut tenir compte :

- de la race des canetons - tests
- de leur âge
- du mode d'administration de l'extrait de culture.

L'extrait est administré au caneton, pendant quatre jours consécutifs, au moyen d'une seringue prolongée d'un tube de polyéthylène long de 8

centimètre. La solution toxique est ainsi conduite jusqu'au gésier de l'animal. La quantité administrée est déterminée en fonction des résultats du dosage chromatographique et selon que l'on veuille, soit entrainer la mort d'une partie des canetons, soit provoquer des modifications hépatiques décelables à l'examen microscopique.

- Si l'échantillon comporte une forte teneur en aflatoxine, les jeunes palmipèdes meurent en 48 heures.

- Si l'échantillon est peu toxique ou atoxique, ils survivent en général jusqu'au 7ème jour, date habituelle du sacrifice.

L'étude statistique de la différence de croît entre les lots de canetons qui reçoivent un extrait toxique et ceux qui ingèrent un régime témoin normal est réalisée (cf page 88).

Le poids du foie est noté à l'autopsie des palmipèdes. L'étude histologique des viscères, lors du décès ou du sacrifice, se pratique de manière classique. Après fixation dans une solution de Na Cl à 9°/$_{oo}$ renfermant 10 % d'aldéhyde formique, puis inclusion en paraffine et découpe, les organes sont colorés par le trichrome au bleu de Masson, par l'hématoxyline ou par l'éosine - safran.

Des colorations plus spécifiques de certains constituants cellulaires: coloration de Hotchkiss - Mac Manus, de Stein par exemple, ou encore de Tirmann-Schmelzer , sont éventuellement pratiquées.

Les lésions hépatiques sont les plus communément rencontrées; elles ont déjà été signalées page 17 .

Une concordance relativement étroite entre les méthodes de dosage chromatographique et biologique se manifeste souvent ; les discordances majeures, occasionnelles, sont probablement imputables aux régurgitations d'une partie de l'extrait ; ces régurgitations éventuelles surviennent rapidement dans le premier quart d'heure après l'ingestion toxique.

Pour cette raison, qui nuit à la précision de la méthode, il est in-

diqué d'opérer sur un lot de plusieurs sujets.

D'autres matériels biologiques considérés parfois comme plus standardisés, tels l'embryon de poulet (141, 189) et les protozoaires Polymastigines (Tetrahymena), ont été préconisés pour le dosage et l'étude de la toxicité, mais pour des raisons de commodités de réalisation expérimentale nous avons préféré utiliser le caneton.

Quelle que soit la méthode choisie, il ne faut pas perdre de vue qu'un résultat négatif au dosage physicochimique ne prouve pas l'innocuité absolue de l'extrait de culture. Tout résultat chromatographique doit être confronté aussi étroitement que possible aux tests biologiques de toxicité.

2/ Dans les aliments souillés par les aspergillus :

- Le champignon présente une affinité particulière pour l'arachide.

= L'utilisation des méthodes qui viennent d'être exposées à permis de préciser que la pollution aspergillaire est maximum quand :

. La légumineuse est recueillie dans un milieu chaud et humide : 85 % d'humidité relative, température : 30°C, donc un climat tropical (18,61).

. Les arachides sont récoltées avant maturité complète ou lorsqu'elles proviennent de plants désséchés sur pied(176).

. L'humidité des graines est supérieure à 16 % d'eau et celle des gousses supérieure à 10 % (18).

= La teneur en aflatoxines des arachides est maximum quand :

. La température est élevée. A 30 °C la production d'aflatoxines hautement toxiques (Aflatoxine B1) devient importante (60).

La toxicité d'autres légumineuses (99), de céréales (146, 182), de graines peut être étudiée de la même façon que dans le cas de l'arachide.

3/ Dans les produits biologiques et les organes des animaux intoxiqués,

a) Urines :

Les urines des rats sont recueillies soit dans des cages à métabolisme, soit dans le dispositif suivant que nous avons réalisé au laboratoire :

Il comprend un réservoir supérieur cylindrique, à plancher grillagé, servant de logement aux animaux pendant la durée de l'expérimentation.

Ce réservoir repose sur un entonnoir de grand diamètre, en polyéthylène, destiné à recevoir les urines. Trois treillis de matière plastique, à mailles fines (1mm), superposés, arrêtent les matières fécales et les souillures alimentaires projetées par l'animal.

L'urine s'écoule de l'entonnoir dans des tubes à essais sous-jacents.

Nous avons fait consommer des régimes à 0,75 ppm d'aflatoxines à de nombreux lots de rats.

La recherche des aflatoxines dans les prélèvements urinaires a été réalisée le plus rapidement possible après les mictions.

L'identification des toxines s'effectue selon la méthode désormais classique de Allcroft et Coll (8), améliorée encore par Holzapfel et Coll (90), Elle comporte :

= l'extraction des prélèvements urinaires : un mélange urines (2 V) méthanol (3 V) est extrait continuellement par le chloroforme pendant 36 heures. Le méthanol est ajouté pour éviter les émulsions.

= Une chromatographie de l'extrait sur Kieselgel G de 3 mm d'épaisseur.

les diverses aflatoxines qui peuvent être découvertes dans les urines des rats intoxiqués sont l' Aflatoxine B1 (rf = 0,56), l'Aflatoxine M1 (rf = 0,34) et l'Aflatoxine M2 (rf = 0,23).

b) sang, fèces et parenchyme hépatique :

L'extraction des aflatoxines de ces divers prélèvements s'effectue par une méthode courante, celle de de Iargh et Coll (57).

Les extraits obtenus sont dissous dans 0,4 ml de chloroforme et des

échantillons de 20 µl sont chromatographiés sur Kieselgel G.

La chromatoplate est développée quand le front de migration du solvant se trouve à 10 cm de la ligne de départ.

- La lecture s'effectue en lumière U.V. dans les conditions habituelles que nous avons déjà signalées (cf page 26).

- Une solution pure d'Aflatoxine B1 sert de témoin de référence pour la détermination des rf des échantillons toxiques.

- les spots chromatographiques communs à ces divers échantillons sont ;

1) un spot bleu violet de rf = 0,56 qui correspond à l'Aflatoxine standard B1.

2) un spot vert de rf = 0,4 qui caractérise l'Aflatoxine G1.

3) un spot bleu violet de rf = 0,2 qui paraît analogue à celui de la "milk toxin" des auteurs anglo - saxons (34).

CHAPITRE III

EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES AFLATOXINES PAR DES TECHNIQUES BIOLOGIQUES, HISTOLOGIQUES, IMMUNOCHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

I - ACTIVITES BIOLOGIQUES DES AFLATOXINES :

Nous avons entrepris simultanément plusieurs études :

1°) Recherche de l'agressivité toxique sur les éléments figurés du sang circulant :

- De fréquentes numérations globulaires sont pratiquées, à la cellule de Malassez, au cours de l'intoxication chronique des rats.
- Les numérations plaquettaires sont périodiques.
- Les formules leucocytaires complètent le bilan hématologique.
- L'étude de la résistance osmotique globulaire est poursuivie tout au long de l'expérimentation.
- Le taux d'hémoglobine dans le sang total est déterminé par spectrophotométrie (38). Les cuves contiennent 20 µl de sang hépariné pour 5 ml de solution de Drabkin *. L'indication donnée par le spectrophotomètre ** est traduite en grammes d'hémoglobine pour cent, à l'aide de courbes - étalons.

* Solution de Drabkin : bicarbonate de soude : 1g
ferrycyanure de potassium : 0,2g
cyanure de potassium : 0,05g
eau distillée : q.s.p. : 1 litre

** Beckman - DU 2 - Spectrophotometer

- Les méthodes de dosage de Tallquist et de Gowers ont été abandonnées du fait de leur imprécision. Elles ne permettent qu'une évaluation très approximative des taux d'hémoglobine.

- La recherche de la falciformation des hématies (test d'Hémelle) n'a retenu qu'occasionnellement notre attention.

2°) Détermination des perturbations sériques éventuelles au cours de l'intoxication :

Nous les avons appréciées par la méthode d'électrophorèse sur papier.

- MATERIEL :

. une cuve à électrophorèse Elphor constituée d'un bac à 3 portoirs.

. un générateur (Paris - Labo)

. papier à électrophorèse Bender et Hobein n° 2043

. tampon de Michaëlis au véronal sodique pH : 8,6

. colorant de Durrum au bleu de bromophénol

- TECHNIQUE :

Avant le dépôt du sérum, la bande de papier est trempée dans le tampon de Michaëlis, essorée entre deux feuilles de papier filtre, puis tendue entre les supports de la cuve.

La quantité de sérum déposé dépend de son taux protéique évalué par réfractométrie.

La migration électrophorétique s'effectue sous une tension de 100 volts pendant 15 heures (Intensité = 2,5 mA pour un support garni de 2 bandes).

Les bandes de papier sont alors séchées à l'étuve à 100° pendant 15 minutes.

La coloration terminale au bleu de bromophénol caractérise les diverses fractions protéiques dissociées.

Une décoloration des protidogrammes en eau acétique à 1% - 3 bains de 5 minutes - et en tampon acétique - 1 bain de 2 minutes - précède le

séchage des bandes sous rayons infrarouge.

Après coloration, les pourcentages respectifs des diverses fractions protéiques du protéinogramme sont évalués par photométrie * suivie d'une planimétrie.

3°) Estimation du bilan azoté des animaux agressés.

On sait déjà que la consommation d'aliments contaminés par A. flavus - ou, d'une manière artificielle, par l'addition d'une aflatoxine - ralentit la croissance des jeunes animaux par rapport à celle de témoins du même âge et du même sexe ingérant la même quantité d'aliments sains (151).

L'intoxication par les aflatoxines a donc pour conséquence de rendre moins favorable le bilan azoté.

Ce fait peut provenir :

a) D'une moins bonne perméabilité de la paroi intestinale aux nutriments, ou encore d'une diminution de la biosynthèse des enzymes digestives.

Dans l'un ou l'autre cas, le coefficient d'utilisation digestive (C.U.D.) de la fraction azotée du régime :

$$C.U.D. = \frac{\text{azote ingéré - azote fécal}}{\text{azote ingéré}} \times 100$$

doit se trouver nettement diminué par rapport à celui des témoins.

b) D'une perturbation de l'utilisation métabolique de la ration azotée, se traduisant par une moins bonne rétention azotée au niveau de l'organisme soumis à l'intoxication par les aflatoxines.

En ce cas, la valeur biologique :

$$V.B. = \frac{\text{azote retenu}}{\text{azote absorbé}} \times 100$$

* Réalisée avec un Analytrol Beckman

$$\text{c'est-à-dire} = \frac{\text{Azote ingéré} - (\text{Azote fécal} + \text{azote urinaire})}{\text{Azote ingéré} - \text{Azote fécal}} \times 100$$

est nettement inférieure à la normale.

c) d'une double action des aflatoxines, à la fois au niveau de l'utilisation digestive et de la valeur biologique.

= Pour la réalisation pratique, il faut connaître la teneur en azote (exprimée en mg/100 g d'aliments) des régimes proposés afin de déterminer les quantités ingérées par chaque animal.

Les fèces et les urines des animaux sont recueillies pendant toute la durée de l'expérimentation ; les teneurs en azote sont évaluées par la méthode classique de Kjeldahl.

= Deux produits - clefs du métabolisme protéique sont recherchés également.

1 - La créatinine urinaire :

. On prépare une solution mère de créatinine à 0,250 g de créatinine dans 250 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Dans trois fioles jaugées de 100 ml, on verse respectivement 4,8 et 12 ml de cette solution préalablement diluée au 1/10ème avec de l'eau distillée. Une quatrième fiole qui servira de témoin contient seulement 8 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N. Dans chacune des quatres fioles on ajoute également 20 ml d'une solution d'acide picrique à 1 % puis 1,5 ml de soude à 10 %. Après une agitation de 15 mn, on complète au trait avec de l'eau distillée et on mesure la densité optique (D.O.) à 520 mμ.

Dans nos conditions expérimentales et compte-tenu de la D.O. du témoin, les D.O. correspondant aux quantités précitées de créatinine sont respectivement de 40, 80, et 120 et se situent par conséquent sur une droite.

Pour doser la créatinurie urinaire, on opère de façon similaire en remplaçant la solution titrée de créatinine par 1 à 4 ml d'urine (et même davantage si la créatinurie est faible).

Les résultats spectrophotométriques sont traduits en utilisant la courbe de référence préalablement établie.

2 - l'urée urinaire :

Pour des raisons de réalisation pratique, elle a été dosée par l'hypobromite. L'expérience a montré que la précision de la méthode était compatible avec le type de recherche poursuivie.

II - MODIFICATIONS HISTOLOGIQUES PRODUITES PAR LES AFLATOXINES

Les techniques utilisées ont été précédemment exposées (page 28)

III - MODIFICATIONS DE L'ETAT IMMUNOLOGIQUE DES ANIMAUX AGRESSES PAR LES AFLATOXINES

A/ Animaux expérimentaux - Méthodes de prélèvement et d'obtention des antigènes et des anticorps

a) Animaux expérimentaux :

- Rats : 300 sujets mâles Wistar Commentry sont nourris "ad libitum" dès le sevrage ; ils reçoivent un régime de base (préparation commercialisée) ainsi que du tourteau d'arachide toxique.

1 - Le régime commercial comporte des farines de maïs et de soja, des issues de céréales, de l'avoine et de la luzerne, de la farine de poisson, des éléments minéraux, des oligoéléments et des vitamines.

Les concentrations en protides, lipides et cellulose pour 100 grammes de régime sont respectivement : protides 16,5 g, lipides 2,92 g

cellulose 6,70 g.

2 - Le tourteau d'arachide a été préalablement humidifié puis contaminé par une souche d'Aspergillus flavus Link ex Fries - entretenue sur milieu de Brian liquide (cf Page 22)-capable d'élaborer abondamment des aflatoxines très toxiques.

- Ce tourteau d'arachide est maintenu à la température de 30° C pendant 15 jours.

- Il est alors stérilisé à sec au four Pasteur à 120°, délipidé au Soxhlet et pulvérisé.

- Le tourteau ainsi obtenu est analysé ; sa concentration en aflatoxine se détermine par dosages chromatographiques (181) et biologiques (157).

- La quantité de tourteau ajoutée est calculée pour que le mélange - tourteau contienne 0,75 ppm d'aflatoxine "totale".

- En fait, il comporte les quatre aflatoxines principales (B1, B2, G1, G2) dont les propriétés biologiques sont partiellement connues; il est particulièrement cancérigène pour les rongeurs.

- Les rats reçoivent ce régime contaminé pendant toute la durée de l'xpérimentation.

- 200 rats témoins reçoivent seulement le régime de base accompagné de la même quantité de tourteau non contaminé.

- Tous les animaux sont pesés deux fois par semaine; la consommation alimentaire de chaque individu et la prise d'aflatoxine des rongeurs intoxiqués sont calculés chaque jour.

- L'ensemble de l'élevage est placé dans des conditions d'hygiène rigoureuse, dans des locaux climatisés, périodiquement désinfectés.

- Lapins : Trente lapins albinos âgés de 8 mois, et d'un poids moyen de 4 kilogrammes, servent à préparer les réactifs nécessaires à la révélation immunochimique c'est-à-dire les immunsérums.

Ils reçoivent un régime commercial standard équilibré. La salubrité des locaux d'élevage fait l'objet d'une surveillance constante.

b) Prélèvements des sérums-antigènes :

Les prélèvements sanguins s'effectuent par ponctions des sinus ophtalmiques du rat (78); après exsudation les sérums sont centrifugés et séparés des globules rouges résiduels - Collectés, ils servent immédiatement à l'expérimentation.

c) Prélèvements des immunsérums anticorps :

Les sérums de lapins hyperimmunisés sont recueillis par deux voies :

1°) - par ponction veineuse à l'aiguille (diamètre 1 mm) de la veine marginale des oreilles : la faible quantité de sérum obtenu permet de déceler - par analyse immunoélectrophorétique - la richesse en immunoglobulines de l'immunsérum.

2°) - par ponction intracardiaque : les 25 ml d'immunsérum prélevés par animal, sont conservés à - 30° C pendant deux mois maximun. Ils sont utilisés sans modification préalable ou après concentration.

- A cette fin, 9 ml d'une solution à 20% de SO4 Na 2 en eau distillée sont ajoutés goutte à goutte et en agitant à 1 ml d'immunsérum. On laisse reposer 3 heures à 37° C.

Un précipité blanchâtre de protéines immunes apparaît; il est séparé par une centrifugation de 10 minutes à 5.000 t/m.

Ce précipité est alors dissous dans 0,25 ml d'eau distillée et l'activité de l'immunsérum se trouve ainsi concentrée quatre fois.

d) Les techniques d'immunisation :

Parmi les différentes techniques d'immunisation que nous avons dû adapter à notre matériel d'étude, deux se sont révélées particulièrement efficaces.

- I° méthode : On utilise 2 séries de 8 lapins.

. L'une est immunisée par un pool de sérums de rats normaux (S.R.N.) âgés de 14 mois.

. L'autre par un pool de sérums de rats âgés de 14 mois qui ingèrent, depuis leur sevrage, un régime contaminé par l'aflatoxine (S.R.A.F.).

1 - une primo injection est poussée dans les coussinets plantaires des lapins amenant 0,1 ml de sérum frais additionné d'alun de potasse à 2 % (0,5 ml pour 6 mg de protéines), émulsionné avec un volume égal d'adjuvant de Freund * complet.

2 - après un repos d'une semaine, une série d'injections bihebdomadaires alternées - une injection sous-cutanée, une injection intraveineuse - (comprenant pour 1 ml : 0,1 ml de sérum, 0,4 ml de sérum physiologique, 0,5 ml d'une solution d'alun de potasse à 2 %) est poursuivie pendant 2 mois et plus.

3 - Les lapins hyperimmunisés sont alors ponctionnés. Les immunsérums recueillis et acceptés, de par leur richesse en anticorps, caractérisent aussi intensément les globulines que les albumines sériques.

* Adjuvant de Freund : mélange liquide et homogène d'huile de vaseline et de lanoline

- IIº méthode :

Elle met en jeu 2 séries de 8 lapins.

Ils reçoivent les 1er, 2ème et 3ème jours d'immunisation une injection intraveineuse de 3 ml (veine marginale des oreilles) d'une solution de Zymosan * préparée de la façon suivante :

70 mg de Zymosan sont incorporés à 20 ml d'une solution de chlorure de sodium à 0,9%. Le mélange est porté à l'ébullition dans un bain marie pendant 10 minutes. Après centrifugation à 3.000 t/m seul le surnageant ,conservé à + 4° C sert à l'immunisation.

Le 11ème jour chaque animal de la première série (8 lapins) reçoit 0,5 ml de sérum (pool S.R.N.) associé à 0,2 ml de la solution de Zymosan par voie intramusculaire.

Les 8 animaux de la seconde série sont immunisés de même manière par un autre pool de sérum (S.R.A.F.).

Ces injections sont répétées le jour suivant. On injecte une dose double le 13ème et le 14ème jour.

L'immunisation est complétée 4 jours plus tard par 2 ml de sérum incorporé à 2 ml d'adjuvant de Freund administré par voie intramusculaire.

- Le titre en immunoglobulines des sérums de lapins est satisfaisant 2 à 3 semaines après la dernière injection du mélange.
- Une injection de rappel 6 semaines plus tard (0,5 ml de sérums dans 1 ml de sérum isotonique) peut renforcer l'immunité.

* Zymosan : extrait de Saccharomyces Cerévisiae

B/ Les réactions immunochimiques

a) L'analyse immunoélectrophorétique (74) :

Il s'agit d'une microméthode réalisée sur plaques de gélose de 76 x 26 mm. Les quantités de substances à analyser, de substrats enzymatiques caractérisant leurs actions ou de colorants les identifiant, sont très faibles.

- MODE OPERATOIRE :

. Réactifs :

a) Solution tampon pH = 8,6 - Force ionique = 0,05 comprenant :
Veronal sodique = 9 g
H Cl N = 6,5 ml
Eau distillée q.s.p. = 1.000 ml

b) Gélose DIFCO (Special agar noble)

c) Eau acétique à 5%

d) Solution aqueuse d'Amido schwartz
Amido schwartz = 0,50 g
Acide acétique = 50 ml
Eau distillée q.s.p. = 500 ml

e) Sérums antigènes

f) Immunsérums anticorps

. Préparation des lames :

- Une suspension de gélose à 2% en tampon véronal (0,5 g de gélose dans 25 ml de tampon) est chauffée au bain marie bouillant.

- 2 ml de gélose chaude sont coulés par lame porte-objet; les lames seront conservées en atmosphère humide, sous boîte de Petri, à 4° C.

. Dépôt de sérum et électrophorèse :

- Après refroidissement de la gélose, 2 ou 3 réservoirs (ou godets) de 2 mm de diamètre sont découpés à l'emporte-pièce.

- Les sérums antigènes étudiés ou comparés sont déposés dans les réservoirs à l'aide d'une pipette capillaire.

- Les lames porte-objet disposés dans l'appareil à électrophorèse (Shandon universal electrophoresis apparatus after Kohn - Mark II *) sont reliées par des ponts de papier filtre (Arches 302), en double épaisseur, aux bacs contenant les électrodes.

Les bacs sont remplis d'une solution tampon de force ionique 0,05. On applique aux électrodes un courant de 100 - 110 V pendant 1 H 50, avec une différence de potentiel de 30 V aux bords de la lame. En ces conditions les constituants protéiques du sérum se trouvent dispersés sur toute la longueur du gel.

. Diffusion des antigènes et des anticorps :

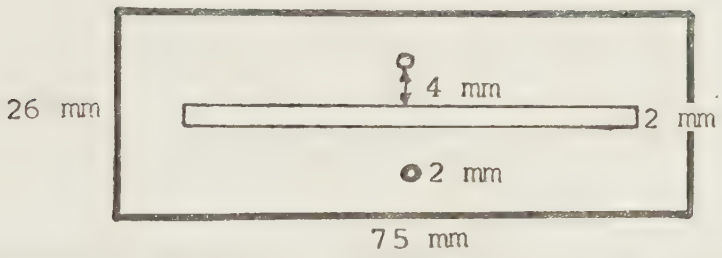
- L'électrophorèse achevée, les lames débarrassées de leurs connections de papier sont recueillies dans l'appareil.

- Une gouttière ou deux (diamètre = 2 mm) - selon le schéma expérimental proposé - peuvent être découpées dans la gélose.

- Les immunsérums de lapins antisérums de rats nécessaires à la révélation immunochimique, les immunsérums monospécifiques d'une fraction antigènique, les immunsérums antisérums de rats normaux (A.S.S.R.N.) ou antisérums de rats aflatoxine (A.S.S.R.A.F.) spécifiquement absorbés, sont déposés dans les gouttières, à la pipette capillaire, sous un volume

* Shandon Scientific Company Limited : 65 Pound Lane Willesden - LONDON NW 10

de 35 µl.



Disposition des plaques pour l'analyse immunoélectrophorétique

Le développement des arcs de précipitation, résultat de la confrontation antigène-anticorps, est réalisé dans une chambre humide à 18° C en 48 heures.

. Lavage - Dessication - Coloration :

- Le lavage des plaques et leur dessication sont des opérations préalables et indispensables à toute réaction de caractérisation.

- Il faut laver les plaques pendant 3 jours, dans une solution de Nacl 0,15 M, pour débarasser la gélose de l'excès d'antigène et d'anticorps qui n'ont pas réagi.

- Les plaques retirées de la solution de lavage, et recouvertes d'une feuille de papier filtre, sont désséchées sous un courant d'air pendant 12 heures.

- Elles sont alors immergées dans une solution aqueuse d'Amido schwartz pendant 15 minutes.

- L'excès de colorant accumulé sur les préparations est éliminé par lavage en eau acétique à 2% ou en eau ordinaire.

- L'interprétation des diagrammes immunoélectrophorétiques colorés se pratique au négatoscope.

b) La migration sérique en gel d'agarose acrylamide (187) :

- PRINCIPE : Un gel mixte d'agarose acrylamide, constitué du mélange homogène d'un polysaccharide naturel (agarose) et d'un polymére d'acrylamide, permet d'effectuer la séparation électrophorétique des solutions protéiques de poids moléculaires variés.

Il est caractérisé :

- par un pouvoir de résolution exceptionnel dépendant des qualités de l'acrylamide utilisée.

- par une élasticité et corrélativement une maniabilité d'autant plus grande que le taux d'agarose incorporé est lui-même plus important.

. Le mélange effectué, la gélification de l'acrylamide est provoquée par différents catalyseurs et par une élévation de la température à un degré plus élevée que le point de gélification de l'agarose.

. Un abaissement ultérieur de la température permet à l'agarose de se gélifier entre les mailles d'acrylamide.

. L'inhomogénéité éventuelle des gels - qui altère la netteté de résolution des fractions protéiques migratrices - dépend de phénomènes d'évaporation pendant la gélification.

. La vitesse de polymérisation du milieu agarose-acrylamide, plus rapide en profondeur qu'en surface (au contact de l'oxygène atmosphérique) peut altérer également l'homogénéité du gel. Il se produit alors un décalage dans la vitesse de migration des fractions protéiques analogues.

. Après de multiples essais, nous avons réussi à surmonter ces difficultés en procédant au coulage du mélange dans une enceinte close. L'amélioration subséquente de la qualité des gels, favorise la reproductivité des résultats et réduit les causes d'erreurs.

- MODE OPERATOIRE : Le choix de notre technique ne s'est arrêté ni sur celle de Raymond (145) qui met en oeuvre un gel en plaque mince rectangulaire moulée dans une cellule rigide spéciale, ni sur celle de Ornstein et Davis (135) qui proposent le fractionnement électrophorétique en colonnes de gels, moulés dans des tubes de verre (disc électrophorésis). Ces techniques exigent en effet un matériel spécial dont nous ne pouvions disposer.

Nous utilisons simplement un gel mixte d'agarose acrylamide, coulé sur plaque horizontale comme support de migration.

1°) Réactifs :

= Solution tampon pour conserver les propriétés physico-chimiques

tris hydroxy-méthyl-aminométhane ... 9 g

glycine ..... 4,68 g

H 20 ..... 900 ml

On complète à 1 litre avec de l'eau déminéralisée neutre et on amène le tampon à pH = 8,7 à l'aide de Hcl N.

= Solution tampon dans les bacs à électrophorèse

tris ..... 3 g

glycine ..... 25 g

H 20 ..... 900 ml

Compléter à 1 litre et amener le pH à 8,7

= Solution stock d'acrylamide

acrylamide ..... 60 g

H 20 ..... 30 ml

. Dissoudre à 50° sous agitation et ajouter N-N'-Méthylène-bisacrylamide = 1,6 g

. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée; cette solution se conserve à 4° C pendant une semaine.

= Solution stock de colorant

Coomasie Brillant Blue R * ..... 250 mg

Méthanol ou éthanol ..... 50 ml

Acide acétique pur ..... 10 ml

Eau distillée ..... 40 ml

Au moment de l'emploi, la solution stock est diluée 20 fois dans de l'alcool méthylique à 40 % contenant 5 % d'acide acétique et 2,5 % de glycérine.

* Etablissements E. Gurr Ltd - London SW 14

2°) Préparation des gels mixtes :

Un moule constitué de 2 plaques de verre à miroir de 27 x 20 cm, siliconées avec du Rhodorsil, maintenues distantes de 3 mm par quatre petits supports de verre, est placé en position horizontale dans une étuve à 55° - 56° C.

Ce dispositif sert à la préparation des gels mixtes qui comportent :

. acrylamide : 12,375 ml de la solution stock
complétée à 75 ml par de l'eau distillée

. agarose : 1 g 10 d'agarose pour 75 ml d'eau distillée

- Les solutions d'acrylamide et d'agarose préalablement, préparées dans des récipients séparés, sont maintenues en surfusion au bain-marie à 55° C.

- Des quantités requises de deux catalyseurs, persulfate d'ammonium = 0,045 g et NNN'N - tetraméthylène - éthylène - diamine = 0,075 ml, sont ajoutées à la solution d'agarose. Après dissolution complète du sel d'ammonium, l'agarose est versée dans l'acrylamide à la température du bain-marie.

- Le mélange est alors coulé dans le moule que l'on place dans l'étuve à 55°; le gel de polyacrylamide se forme en 30 minutes.

- Il est transféré dans un réfrigérateur à 4° C puis lavé pendant 16 heures avec une solution tampon à pH = 8,7. Il sert alors de support pour la migration électrophorétique.

3°) L'electrophorèse :

- La feuille de gel recueillie dans la solution tampon est essorée entre deux feuilles de papier filtre.

- Elle est étendue sur une plaque - support en verre.

- Les réservoirs de départ sont découpés à l'emporte - pièce dont les lames tranchantes sont distantes de 2 mm.

- L'échantillon de sérum à analyser, dilué au 1/10ème, chauffé au bain-marie à la température de 40° C, est mélangé avec un volume égal de solution aqueuse à 1,6 % de gélose maintenue en surfusion à 40° C.

- L'ensemble peut être coulé dans les réservoirs à l'aide d'une pipette Pasteur pré-réchauffée par plusieurs aspirations et refoulements du mélange.

- Le gel est recouvert d'une feuille de cellophane, pour éviter les pertes d'eau par évaporation au cours de l'électrophorèse.

- Le dispositif gel-plaque est réuni aux cuvettes porte-électrodes remplies de solution tampon, par les extrémités de la feuille de gel dépassant les bords de la plaque.

- La migration électrophorétique du sérum est réalisée en 3 heures sous une différence de potentiel de 10 volts par cm de gel.

4°) Coloration - lavage séchage :

- Les gels sont immergés pendant 16 heures dans des bains colorants de Coomasie Brillant Blue R.

- L'excès de colorant est éliminé par lavage à l'eau distillée; il est fixé par un lit de résines échangeuses d'ions disposé au fond de la cuve de lavage. La cuve elle-même est placée sur le plateau d'un agitateur à oscillation.

- Les gels sont sèchés ultérieurement pendant 8 heures à 56° C, entre deux épaisseurs de papier filtre dur.

c) Les réactions d'hémagglutination - inhibition :

Le principe et la réalisation de telles méthodes relativement complexes paraît justifier quelques précisions préliminaires.

L'hypothèse de départ est de révéler la présence de particules ou antigènes hépatiques dans le sérum des animaux expérimentaux qui constituent une nécrose du foie.

La réaction d'hémagglutination-inhibition comporte schématiquement :

a) le sérum des rats étudiés

b) un immunsérum antifoie de rat

c) des hématies de mouton sensibilisées par des antigènes hépatiques.

Quand le sérum des rats ne contient pas de fractions hépatiques, l'immunsérum antifoie provoque alors l'agglutination des hématies sensibilisées artificiellement par la poudre de foie.

L'hémagglutination positive permet donc de suggérer que le rat expérimental étudié ne constitue pas de nécrose hépatique.

Quand il se crée un complexe : antigènes hépatiques sériques - immunsérum antifoie de rat, l'hémagglutination devient impossible.

Une hémagglutination négative paraît un argument de présomption essentiel pour affirmer l'apparition ou la pérennité d'une nécrose du foie chez l'animal intoxiqué.

Pour la réalisation pratique, il existe quatre variantes dont certaines ont dû être adaptées à notre matériel d'étude, ainsi qu'il sera précisé.

1°) Emploi d'hématies tannées selon le protocole proposé par Boyden et Coll (30).

- Les érythrocytes de mouton, après lavages réitérés en sérum physiologique, sont centrifugés (600-1.000 t/m). Le culot globulaire est conservé. 1 volume de culot est mis en suspension dans environ 30 volumes de tampon P.B.S. * à pH = 7,2.

- La densité optique de toute suspension globulaire utilisée - déterminée aux colorimètre - doit être identique.

- Une solution au 1/20.000ème d'acide tannique sert à préparer les hématies.

- Il faut 1 ml de cette solution pour tanner 1 ml de suspension cellulaire au sein d'un tampon P.B.S.. L'incubation se pratique au bain-marie à 37 ° pendant 10 minutes.

- Après lavage et centrifugation les érythrocytes sont recueillis dans 5 volumes de tampon à pH = 6,4.

Cette acidité favorise le couplage des fractions hépatiques sur les globules rouges.

- Préparation des antigènes hépatiques pour la sensibilisation des hématies :

. 10 mg de foie lyophylisé de rat normal ou 10 mg de foie de rat cancéreux, selon la modalité expérimentale choisie, sont homogénéisés dans 1 ml de tampon à pH = 6,4 (Homogénéiseur = Biorex). Après centrifugation de la suspension, à 3.000 t/mn pendant 10 minutes, le surnageant recueilli est amené à la concentration indispensable pour le couplage des hématies préparées.

* Tampon P.B.S. NaCl = 7,650 g/ Po4 Na2 = 0,724 g/Po4HK = 0,210 g pour 1 litre d'eau distillée.

On utilise une préparation à 2,5 mg d'antigènes hépatocellulaires/ml de tampon à pH = 6,4 pour sensibiliser une suspension à 2,5 % d'érythrocytes tannés :

- Le mélange est placé à 18 ° C pendant 30 minutes, puis centrifugé.
- Les cellules sont lavées et conservées temporairement en sérum de lapin normal dilué au 1/100ème.

2°) Utilisation d'hématies formolées et tannées selon la méthode de Daniel et Coll.

- Le sang de mouton collecté est ajouté à 1,5 volumes de solution d'Alsever *. Les érythrocytes sont recueillis après centrifugation.

- Un volume de la suspension globulaire (à 8 % en tampon pH = 7,2) est agité dans un volume de solution à 3 % de formolaldehyde. Le couplage se fait progressivement, en 18 heures, à la température du laboratoire.

- Un lavage des hématies, en sérum physiologique, élimine l'excès de formol

* Solution d'Alsever (pH = 6,1)

Glucose anhydre pur	10,10 g
Citrate trisodique $5H_2O$	4 g
Chlorure de sodium	2,10 g
Acide citrique à 10 %	2 ml
Azothydrate de Na	0,50 g
Eau bidistillée q.s.p.	500 ml

- Cette suspension est alors amenée à 2,5 % de globules formolés/ml de tampon P.B.S., puis un volume de cette préparation, mélangé à un volume d'une solution au 1/20.000ème d'acide tannique, est incubé à 37° pendant 25 minutes.

- Après centrifugation et lavages, les cellules seront dispersées dans 5 volumes de tampon à pH = 6,4.

- On utilisera la préparation de poudre de foie de rat lyophilisé, à 0,75 et à 1 mg d'antigènes hépato-cellulaires/ml de tampon à pH = 6,4, pour sensibiliser la suspension renfermant 2,5 % d'hématies formolées et tannées.

- Le couplage sera réalisé à 18° pendant 40 minutes.

- Les globules rouges préparés, lavés et centrifugés, seront conservés en sérum de lapin normal dilué au 1/200ème.

3°) Préparation des érythrocytes formolés, conjugués à l'antigène par la benzidine bis-diazotée.

- La solution de B.D.B. est réalisée selon la technique de Kabat et Mayer (97) : à 46 cg de benzidine base (Baker C.P.) dissous à froid dans 100 ml de solution 0,25 NHCl; on ajoute 35 cg de $Na\ No_2$ dilués dans 10 ml d'eau distillée.

- Après agitation prolongée, le mélange porté à 0° C est distribué, par fractions de 2 ml contenant 8,4 mg de benzidine, dans des ampoules de verre pyrex qui seront immédiatement scellées. Une telle préparation réfrigérée à - 70° C conserve ses propriétés pendant 6 mois.

Le protocole expérimental s'inspire conjointement de ceux de Butler (37) et Stavitsky (167, 168, 169, 170) et résulte d'un long travail de mise au point :

- 0,1 ml d'une suspension à 50 % d'hématies formolées de mouton sont ajoutés à 2 ml de tampon P.B.S. et à 1 ml d'une préparation renfermant 2 mg d'antigènes hépatocellulaires/ml de tampon à pH= 6,4.

- 0,15 ml de la solution de benzidine bisdiazotée, conservée à - 70° C, sont nécessaires pour le couplage.

- Le mélange total est mis à incuber à 37° C pendant 20 minutes puis il est centrifugé pendant 10 minutes à 2.000 t/m ; le culot globulaire obtenu est recouvert de 2 ml de tampon P.B.S.. Cette suspension à 2,5 % environ d'érythrocytes est alors stockée à + 4° C.

4°) Traitement des hématies par la glutaraldéhyde, agent de couplage proposé par Avrameas et Coll (21).

- La sensibilisation des érythrocytes, en milieu tampon à pH = 7,2, est obtenue en mélangeant 1 ml de la préparation antigénique précédente renfermant 2 mg d'antigènes hépatocellulaires/ml à 3 ml de la suspension de globules rouges de mouton à 2,5 % et à 0,4 ml d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 2,5 %.

- Le couplage s'effectue sous agitation permanente, au bain-marie à 56° C pendant 1 heure.

- Les cellules sont alors lavées en tampon P.B.S., centrifugées puis dispersées dans un sérum de lapin dilué au 1/100ème.

- Il faut ensuite éliminer les hémagglutinines naturelles antiglobules rouges de mouton contenues éventuellement dans les sérums de rats examinés. Ces hémagglutinines éventuelles sont saturées par des

érythrocytes de mouton couplés à la glutaraldéhyde mais indemnes de tout antigène.

- Préparation des immunsérums antifoie de rat normal et antifoie de rat cancéreux nécessaires à l'hémagglutination-inhibition :
  . Ils sont obtenus par la méthode d'immunisation de Neuhauss et Coll (130).
  . Chaque volume d'immunsérum antifoie recueilli, dilué 10 fois à l'aide d'un tampon P.B.S., est ajouté à un égal volume de sang de rat citraté; la suspension est incubée à la température du laboratoire pendant 3 heures, puis centrifugée à 2.000 t/m pendant 5 minutes. Les fractions anticorps antiprotéines sériques et antiglobulaires sont ainsi éliminées en un premier temps. Seules demeurent en solution les fractions anticorps anti-protéines hépatiques.
  . Cependant, par précaution, pour débarrasser le surnageant recueilli de toute fraction anti-tissulaire non hépatique, 30 mg de poudre de rein de rat lyophilisé sont mélangés à 2 ml de l'immunsérum absorbé préalablement, dilué au 1/5ème.
  . Après agitation vigoureuse et incubation pendant 2 heures à 18° C, une dernière centrifugation du mélange à 3.000 t/m pendant 15 minutes permettra d'obtenir un surnageant qui constitue l'immunsérum antifoie de rat spécifique nécessaire à la technique utilisée.

- La réaction d'hémagglutination - inhibition :
  . Le tube réaction comporte 0,5 ml de sérum de rat. Ces sérums de rats sont décomplémentés et distribués généralement de 1/2 en 1/2 à partir d'une dilution au 1/10ème dans du sérum de lapin dilué au 1/200ème.

- Ils sont absorbés par des érythrocytes de moutons pour éliminer les fausses agglutinations (1 volume d'une suspension à 50 % d'hématies/ 1 volume de la dilution première 1/10 du sérum étudié).
- Après centrifugation, le surnageant recueilli, la gamme de dilution est complétée.
- A chaque tube on ajoute 0,5 ml d'immunsérum antifoie de rat spécifique amené à la concentration de 5 unités ou de 10 unités hémagglutinantes/ml.
- Le mélange est incubé à la température du laboratoire pendant 30 minutes.
- En dernier lieu, 0,1 ml de la suspension à 2,5 % d'hématies (tannées ou formolées et tannées, ou formolées et couplées.. etc), sensibilisées par l'antigène hépatique normal ou cancéreux, est ajouté au tube-réaction.
- La lecture de l'hémagglutination s'effectue 12 heures plus tard.
- 0,5 ml de sérum de rat normal ou 0,5 ml d'une solution saline comportant une quantité connue de foie de rat lyophilisé, sont substitués au sérum de rat expérimental et servent de témoins.
- La réaction d'hémagglutination, adaptée du protocole d'Avrameas et Coll (21), se pratique en microplaques. A cette fin 5 gouttes de chaque dilution du sérum étudié sont agitées dans 5 gouttes d'immunsérum antifoie de rat spécifique. 1 goutte de la suspension d'hématies sensibilisées est ajoutée au mélange.
- La lecture des résultats s'effectue après la 1ére, 3ème puis 12ème heure.

. La réaction témoin se pratique dans les mêmes conditions, mais avec des hématies traitées par la glutaraldéhyde et non recouvertes d'antigène.

. Enfin, une réaction éventuelle et génante d'autogglutination spontanée des érythrocytes, est mise en évidence par leur confrontation avec du sérum de lapin dilué au 1/100ème.

IV - CONTROLE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE DES AFLATOXINES

Les dosages hormonaux ont concerné les 17 cétostéroides urinaires et les 17 hydroxystéroides. Des essais préliminaires avaient en effet montré que l'intoxication par les aflatoxines modifiait profondément leur biosynthèse.

A/ 17 cétostéroides urinaires :

La technique utilisée pour leur dosage est celle de Silber et Porter (161).

Elle comprend successivement :

a) hydrolyse :

100 ml d'urine sont chauffés dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux.

Dès le début de l'ébullition, 10 ml d'acide chlorhydrique pur y sont versés goutte à goutte. L'hydrolyse est réalisée en 10 minutes.

Le contenu du ballon refroidi, filtré, et l'eau de rinçage des parois (10 ml), sont transvasés dans une ampoule à extraction d'hormone.

b) extraction :

Dans l'ampoule on verse encore 30 ml de chloroforme anesthésique et 0,3 ml de solution de Bradasol Ciba 5 %.

Après agitation de 5 à 10 minutes, les liquides se séparent dans l'ampoule à extraction. La phase inférieure chloroformique est récueillie dans un Erlenmeyer de 100 ml. La phase aqueuse est conservée dans l'ampoule.

Deux extractions analogues sont encore pratiquées. Les 90 ml de solution chloroformique rassemblés sont filtrés.

c) lavages :

La phase aqueuse ainsi épuisée est rejetée.

L'ampoule est rincée avec quelques ml de chloroforme qui sont ajoutés aux précédents extraits.

La solution chloroformique est alors versée dans un mélange comprenant 20 ml de soude 2N et 0,3 ml d'une solution de Bradasol. Après 10 minutes d'agitation, les liquides se séparent dans l'ampoule maintenue verticale.

La phase aqueuse est rejetée. La phase chloroformique, recueillie dans un Erlenmeyer, est lavée à trois reprises :

1°) avec 20 ml de soude 2 N

2°) avec 20 ml d'une solution à 10 % de sulfate de soude cristallisé

3°) avec 20 ml d'eau distillée.

d) évaporation :

5 ml de chloroforme seront utilisés pour le lavage de l'Erlenmeyer. Ils sont joints à la précédente solution et l'ensemble est évaporé dans un évaporateur rotatif.

L'extrait obtenu est repris par 5 ml d'alcool absolu et le mélange est versé dans un tube à hémolyse.

Après centrifugation, une partie aliquote est prélevée dans la partie supérieure, limpide, de la solution, et sert au dosage de l'hormone.

e) dosage colorimétrique :

La gamme de la réaction est constituée ainsi :

Réactions	Etalons * *				Dosage	Témoins		
	40 µg	80 µg	120 µg	160 µg		Réactifs	KOH	U.I.
Solution étalon D.H.A.* 0,4 %	0,1	0,2	0,3	0,4				
Alcool absolu	0,4	0,3	0,2	0,1		0,5	0,7	0,2
Extrait urinaire					0,5			0,5
Sol. de potasse	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sol. Metadinitrobenzène	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		

* Déhydroépiandrostérone

** Le mélange en proportions différentes des divers réactifs - Déhydroépiandrostérone, alcool absolu, potasse, métadinitrobenzène - permet d'obtenir des solutions étalons de 17 cétostéroides respectivement à 40 µg/ml (4 mg/l.), à 80 µg/ml (8 mg/l.), à 120 µg/ml (12 mg/l.) et à 160 µg/ml (16 mg/l.)

Les tubes sont portés à l'étuve à 37° C pendant 1 heure, puis dans un bain de glace pendant 5 minutes pour stabiliser la coloration.

5 ml d'éthanol à 56 % et 2,5 ml de chloroforme sont alors versés dans chaque tube.

Ces solutions sont conservées dans la glace mais seront plongées dans un bain-marie à 40° C avant la lecture spectrophotométrique.

f) interprétation numérique de l'intensité de la réaction colorée :

La densité optique (D.O.) est lue à 440 mμ, 520 mμ et 600 mμ; le réglage de l'appareil au 0 est effectué sur un échantillon de chloroforme pur.

Il convient alors de pratiquer la correction d'Allen pour chacun des résultats obtenus au cours des réactions étalons, dosages et témoins :

$$D.O\ 520\ ^{*} - \frac{(D.O.\ 440 + D.O.\ 600)}{2} = D.O.\ \text{corrigée}$$

* D.O. 520 = densité optique lue à la λ = 520 mμ
La densité optique d'un même tube est lue à la λ = 520 mμ, 440 mμ 600 mμ.
A 520 mμ on lit une densité globale correspondant respectivement à la densité de la réaction propre ent dite et à la densité des réactions parasites associées.
Les lectures à 440 mμ et à 600 mμ permettent de déterminer la valeur de la densité optique des réactions parasites ignorées au cours de l'observation à 520 mμ.

La densité optique définitive de chaque tube est obtenue en tenant compte de sa densité optique corrigée.

1°) D.O. définitive de l'extrait urinaire = D.O. corrigée de l'extrait urinaire - (D.O. corrigée du Témoin réactifs + D.O. corrigée du Témoin urine)

2°) D.O. définitive de l'étalon = D.O. corrigée de l'étalon - D.O. corrigée du Témoin réactifs.

Une gamme d'étalonnage préétablie permet de connaître la quantité (en µg) de 17 cétostéroides contenus dans 0,5 ml d'extrait correspondant à 10 ml d'urine.

La traduction des résultats en mg de 17 cétostéroides/ litre d'urine est obtenue en divisant le nombre de µg par 10.

Ces résultats sont rapportés au volume d'urine émise par 24 heures.

B/ 17 hydroxycorticoïdes urinaires :

La méthode de Cahen et Salter (39) d'après Henry et Thévenet (83) utilisée pour le dosage comprend :

a) hydrolyse :

. A 10 ml d'urine limpide, filtrée et versée dans un tube à essai, on ajoute successivement :

- 1 ml de tampon acétoacétique pH = 5,2
- 0,1 ml de suc gastrique d'Hélix pomatia (soit 10.000 U. de β-glycuronidase)
- de l'acide acétique au 1/10 pour ajuster le pH à 5,2 $\pm$ 0,1.

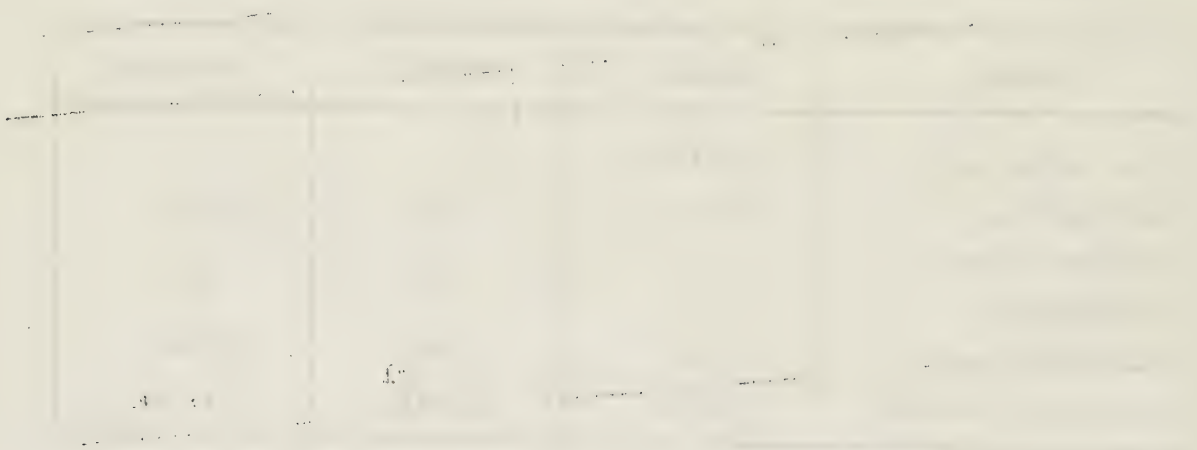
. Le tube est agité, bouché et porté à l'étuve à 37° C pendant 20 heures.

b) extraction :

. Le pH de l'urine hydrolysée est de 5,2

. Le programme d'extraction peut se résumer en un tableau :

Tubes	Urines	Etalons	Réactifs
Urine hydrolysée	totalité		
Eau distillée	2 ml	7 ml	6 ml
Solution étalon de Cortisone	0	5 ml	0
Chloroforme pur	50 ml	50 ml	25 ml
Solution de Bradasol	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml



. Après 2 minutes d'agitation les liquides se séparent dans les ampoules à extraction.

. Les phases aqueuses sont éliminées; les phases chloroformiques sont recueillies et lavées dans les ampoules à extraction.

c) Lavage :

Il est réalisé, sur agitateur à oscillation, par une solution soude-Bradasol.

Tubes	Urines	Etalons	Réactifs
Soude $\frac{N}{10}$	10 ml	10 ml	5 ml
Solution de Bradasol	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml

Après deux minutes d'agitation la phase chloroformique est recueillie dans un erlenmeyer.

d) dosage colorimétrique :

Elle est effectuée dans des tubes marqués :

Tubes	Dosage	Témoin urine	Etalon * 5 µg	10 µg	20 µg	Témoin Réactif
Extrait chloroformique correspondant à	20 ml	20 ml	2 ml	4 ml	8 ml	20 ml
Chloroforme pur	0	0	18 ml	16 ml	12 ml	0
Mélange alcool - acide sulfurique		6 ml				
Réactif de Silber et Porter à la phenylhydrazine	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml

. Les tubes bouchés sont agités à la main pendant 2 minutes.

. Les deux phases se séparent dans les tubes maintenus verticaux.

. La phase chloroformique inférieure est éliminée à l'aide d'une pipette Pasteur, reliée à une fiole à vide.

* Ici aussi le mélange en proportions différentes des divers constituants de la réaction (extrait chloroformique, chloroforme...) permet de constituer des solutions étalons respectivement à 5 µg/ml, à 10 µg/ml, à 20 µg/ml de cortisone.

. La phase aqueuse est centrifugée à froid 5 minutes (3.000 t/m).

. Après élimination du culot, la partie supérieure alcoolo-sulfurique est maintenue au bain-maire à 60° C pendant 30 minutes, puis dans la glace pendant 5 minutes pour stabiliser la coloration.

- Intéprétation numérique de l'intensité de la réaction colorée :

La densité optique (D.O.) est lue à 410 mμ; le réglage de l'appareil au 0 est effectué sur un mélange alcool-acide sulfurique.

La correction du résultat de chaque lecture est nécessaire; ainsi l'on a :

1°) D.O. définitive de la solution étalon = D.O. de la solution étalon - D.O. du Témoin réactifs.

2°) D.O. définitive de l'extrait urinaire = D.O. de l'extrait urinaire - (D.O. du témoin urine + D.O. du Témoin réactifs).

= On peut construire préalablement une courbe de référence à l'aide de solutions diluées de teneurs croissantes en cortisone; ces solutions sont soumises aux traitements chimiques réservés aux échantillons d'urine.

La courbe préétablie permet de déterminer très rapidement (en μg/ml ou en mg/l.) la quantité de cortisone contenue dans les échantillons d'urines à analyser.

Les résultats sont rapportés au volume d'urine émis par 24 heures.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE IV

.TOXICITE COMPAREE DE DIFFERENTS CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES
. CONTAMINATION DE DIVERSES DENREES ALIMENTAIRES VEGETALES PAR ASPERGILLUS FLAVUS

I - TOXICITE COMPAREE DE DIFFERENTS CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES :

Aspergillus flavus trouve en zones tropicales, dans les climats chauds et humides, les conditions idéales à son développement, mais, en fait, toutes les moisissures polluant les denrées alimentaires fructifient très abondamment dans les pays africains.

Certaines seraient même capables d'attaquer les végétaux, notamment l'arachide en cours de végétation; d'autres saprophytes, se développent sur les denrées conservées dans les locaux insalubres parce qu'à la fois trop chauds et trop humides.

L'agressivité de ces contaminants est mal connue. Nous avons valu préciser si elle est nulle, inférieure ou plus élevée que celle des aflatoxines.

En cas de résultat positif, il convient évidemment d'en tenir compte afin d'éviter au consommateur un risque inhérent à l'ingestion accidentelle de moisissures toxiques.

Les champignons présumés toxiques que nous avons étudiés se rapportent aux espèces et aux genres suivants :

. Aspergillus niger
. Botryodiplodia théobromae
. Curvularia lunata

. Macrophomina phaséoli
. Rhizopus arrhizus
. Sclérotium rolfii
. Pénicillium sp
. Céphalosporium sp
. Thielavia sp

1 - Aspergillus niger Tiegh : c'est une moisissure couramment rencontrée dans les régions chaudes et qui parasite fréquemment l'arachide. Elle s'attaque aux jeunes plantules déjà sorties de terre. A. niger se développe sur l'axe hypocotylé de la plante sous forme d'un bourrelet de moisissures de couleur noire. Le champignon peut ceinturer complètement la tigelle et le jeune pied flétri; il envahit aussi les graines d'arachide endommagées. Il fructifie à la surface des téguments en éliminant une poudre noire pulvérulente.

2 - Botryodiplodia théobromae Pat. : se rencontre fréquemment sur de nombreuses plantes des zones tropicales. Ce champignon est souvent présent sur les graines d'arachide qu'il colore en noir.

3 - Curvularia lunata (Wakk.) Boed : est un champignon extrêmement polyphage, très commun dans les régions tropicales. Il se développe sur les légumineuses (arachide) sur les graminées (maïs, riz) sur les tubercules (sorgho). C'est souvent un parasite d'action secondaire.

Les isolements pathogènes sont réalisés à partir des graines de sorgho recouvertes d'un feutrage noirâtre en surface.

Curvularia lunata se caractérise par des conidies à courbures

dissymétriques, conidies septées présentant une cellule médiane supérieure plus volumineuse et plus foncée que la cellule médiane sous-jacente. Les cellules apicales et basales sont nettement plus claires.

4 - Macrophomina phaseoli (Mambl.) Ash. : représente une espèce complexe et confuse car très répandue sous sa forme stérile (sclérotes).

L'appelation Macrophomina phaséoli correspond au stade pycnide du champignon. Au Sénégal cette forme se développe mal in vitro; elle apparaît plus volontiers sur les débris végétaux et notamment sur les tiges.

Sur l'arachide c'est surtout la forme stérile Rhizoctonia bataticola (Taub) Butl-proparte qui prolifère. Rhizoctonia se caractérise par son mycélium d'abord blanchâtre, puis gris foncé; il est parsemé de nombreux points noirs très petits qui représentent les sclérotes. Ces derniers sont visibles sur les racines, sur les gousses et dans les graines. Macrophomina phaseoli est un agent de flétrissement de l'arachide; il parasite également les fruits et donc les semences.

- La distinction entre : Botryodiplodia - Macrophomina se fait sur la présence de sclérotes typiques que comporte seule cette dernière espèce.
  En Gambie, ces deux moisissures contaminantes, provoquent l'apparition du "concealed damage" et des "black nuts" lorsque les pluies survien-nent au cours de la récolte.

5 - Rhizopus arrhizus Fish : est isolé des graines d'arachide. Il semble n'être qu'un saprophyte végétal.

6 - Sclerotium rolfii : est un champignon ubiquiste des régions chaudes du globe. Il peut s'attaquer à de très nombreuses plantes : cotonnier, riz, manioc, tomate....; sur l'arachide, l'attaque débute généralement au collet et se généralise ; les graines sont recouvertes d'un mycélium blanc, en réseau.

7 - Cephalosporium sp : peut s'isoler à partir des graines de plusieurs variétés de sorgho qui présentent une efflorescence, blanc rosé, en surface.

8 - Penicillium sp : est recueilli sur les graines de sorgho également. C'est une moisissure commune qui recouvre les semences d'un feutrage verdâtre.

9 - Enfin Thielavia sp : se développe souvent dans le sol. C'est un champignon saprophyte de divers végétaux dont l'arachide.

A priori, tous ces contaminants posséderaient un potentiel toxique dont on ne connaît, ni l'éventuelle importance, ni les manifestations biochimiques et biologiques.

Nous les avons ensemencé sur des lots d'arachide, de sorgho ou de Pennisétum stériles. Les mycéliums se développent rapidement à l'étuve à 37° C.

Une stérilisation des échantillons à l'autoclave précéde la préparation des extraits fongiques et la détermination de leurs métabolites toxiques.

Des contaminations fongiques expérimentales aussi denses, qui représentent les pires conditions de pollution jamais réalisées au cours

de la conservation des denrées, demeurent exceptionnelles dans la nature. La détermination des propriétés physicochimiques et biologiques des extraits chloroformiques de moisissures, s'effectue par les méthodes décrites de chromatographie en couche mince et par les tests de toxicité sur canetons d'un jour.

a) Dosages chromatographiques (181) :

Les extraits préparés à partir de Macrophomina phaséoli sont caractérisés, à l'examen en lumière ultraviolette, par un spot bleu-violet de rf inférieur à celui de l'Aflatoxine B1 (0,47 contre 0,56).

Les extraits de culture de Botriodiplodia theobromae sont caractérisés par un spot bleu de rf très voisin de celui de M. phaséoli.

Sur les chromatogrammes des extraits d'autres moisissures telles : Curvularia lunata, Penicillium sp et Sclérotium rolfii, l'on peut observer de petites tâches jaunes ou verdâtres de rfs inférieurs à celui de l'Aflatoxine B1. Des spots analogues ont été décrits au cours des dosages chomatographiques de nombreux extraits végétaux. (cf page 69 bis).

b) Résultats des dosages biologiques sur canetons d'un jour :

Ces dosages s'effectuent selon deux protocoles :

1°) par administration aux animaux des extraits préparés, selon la méthode préconisée par le Tropical Products Institute pour l'aflatoxine (cf page 25).

2°) la technique utilisée pour l'extraction de l'aflatoxine n'étant pas obligatoirement la meilleure pour l'obtention des

Chromatographie en couche mince de divers extraits chloroformiques de moisissures présumées toxiques.

Fluorescence en UV:
- -V=Violet.
- -BV=Bleu violet.
- -B=Bleu.
- -BV^t=Bleu vert.

métabolites élaborés par d'autres moisissures, nous avons incorporé les tourteaux pollués au régime habituel d'un lot de canetons; un lot témoin reçoit une alimentation comportant une même teneur en tourteaux sains; un régime composé essentiellement de tourteaux contaminés par Aspergillus flavus est proposé au reste de l'élevage.

On constate les résultats suivants :

- Les animaux qui ingèrent le régime pollué par Aspergillus flavus meurent dans les quatre premiers jours de l'expérimentation.
- Les deux autres séries conservent un état physiologique satisfaisant jusqu'au sacrifice au 10ème jour.

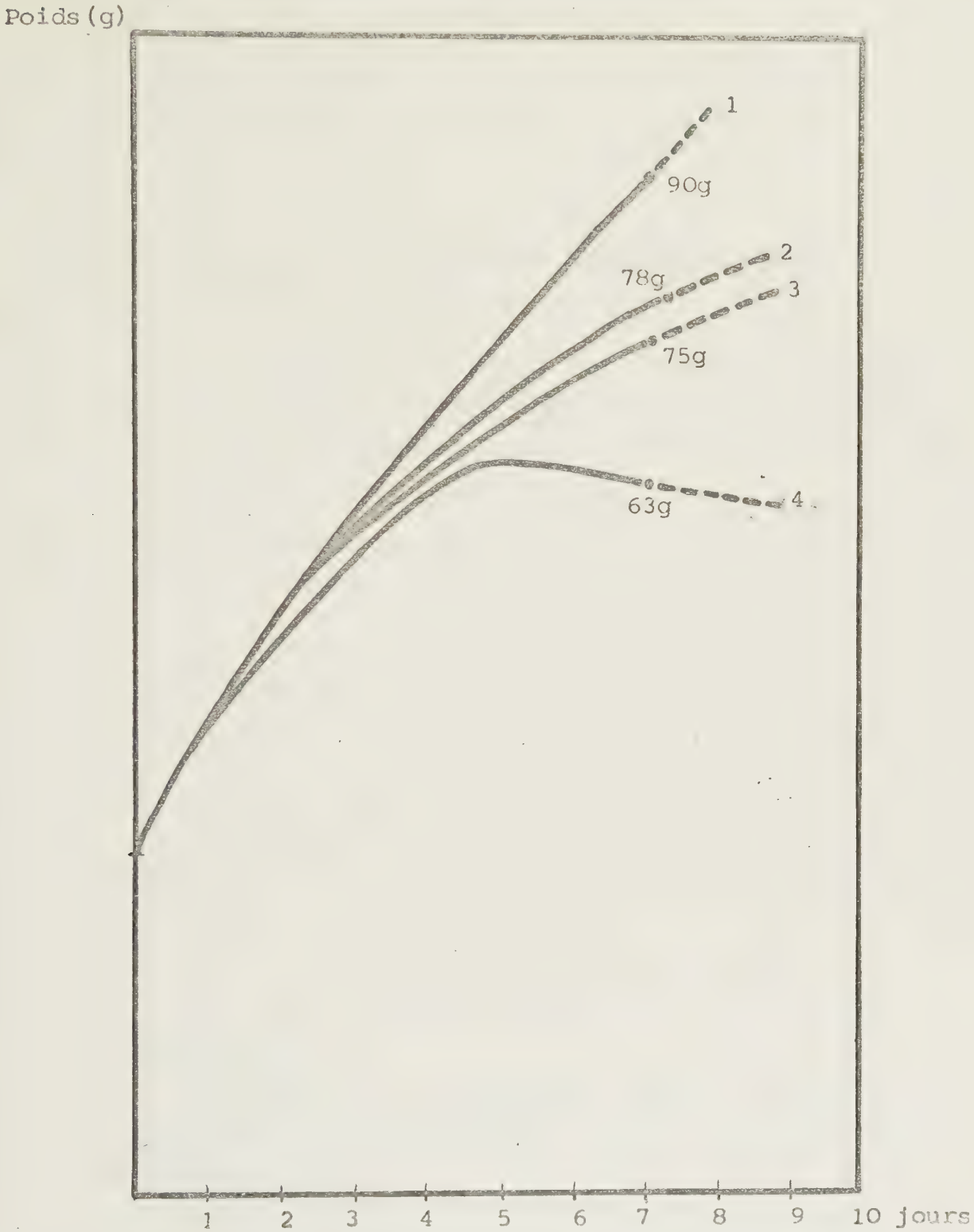
  Cependant des retards de croissance marqués sont notés pour les canetons consommateurs de tourteaux contaminés par Penicillium sp et par Botrioplodia théobromae (cf page 70 bis)

L'examen anatomo-pathologique, pratiqué immédiatement après la mort des sujets intoxiqués par Aspergillus flavus, met toujours en évidence une prolifération périportale basophile associée ou non à la nécrose du parenchyme hépatique.

Seules, parmi les autres moisissures contaminantes, Botrioplodia théobromae, Aspergillus niger, Cephalosporium sp et à un degré moindre Macrophomina phaseoli et Mucor sp, déterminent la prolifération périportale. Une légère nécrose hépatique est provoquée par l'ingestion d'extraits de Botrioplodia théobromae.

Il apparaît donc que les moisissures communes, contaminants banaux des produits vivriers africains, ne secrètent pas de métabolites toxiques comparables à ceux d'Aspergillus flavus.

Allure générale des courbes de croissance pondérale des canetons soumis à différents régimes.



1- régime témoin standard.

2- tourteaux contaminés par B. théobromae.

3- tourteaux contaminés par Pénicillium sp.

4- tourteaux contaminés par A.flavus. (Dose totale d'aflatoxine ingérée/caneton=30µg).

II - CONTAMINATION DE DIVERSES DENREES ALIMENTAIRES VEGETALES PAR ASPERGILLUS FLAVUS

Le postulat initial : la graine d'arachide est la seule denrée aliméntaire contaminée par Aspergillus flavus, s'est révélé érroné.

Si l'arachide est fréquemment polluée, d'autres produits vivriers africains le sont autant, sinon davantage.

Ces observations reposent le problème de la conservation des produits alimentaires de toute origine et de toute nature.

Nous avons relevé parmi les supports végétaux de la toxicité aspergillaire : les mils et les sorghos, les paddys et les riz , le maïs, les haricots niébés, les manioc et les patates douces.

Ces diverses denrées étaient collectées dans les "seccos" des coopératives agricoles, souvent mal protégés des intempéries.

Les multiples échantillons recueillis étaient partiellement recouverts de moisissures, présentant les caractères macroscopiques des aspergillus que nous avons préalablement cités (page 20).

a) Mils et sorghos : 44 échantillons ont été examinés, deux seulement étaient contaminés à de faibles taux (0,03 à 0,04 ppm d'aflatoxines).

b) Paddys et riz : 17 échantillons de différentes variétés de paddy furent testés; 9 échantillons renfermaient des aflatoxines (de 0,03 à 2 ppm).

Plusieurs méthodes de décorticage, par pilonnage familial, en rizerie miniaturisée ou en grande rizerie furent utilisées. Malgré

quelques résultats contradictoires il semble que l'usinage réduise le taux des aflatoxines. Celles-çi seraient surtout localisées dans les parties externes du grain.

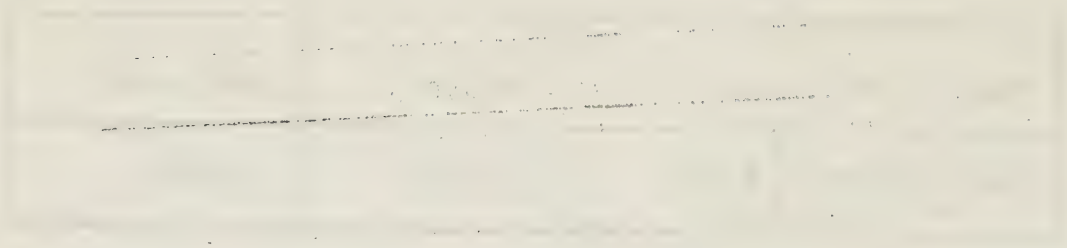
Toury (183) a résumé ces résultats dans un tableau très représentatif dont nous avons contrôlé l'exactitude :

VARIETES DE RIZ	TENEUR EN AFLATOXINE (en ppm)		
	Paddy	Riz décortiqué au mortier	Riz décortiqué usiné
Variété 6178	1,9 à 2,5	≠ 0,15	0,08 à 0,10
Variété Tunsart	≠ 0,75	≠ 0,06	≠ 0,03

c) Les maïs : sur 14 échantillons examinés, deux étaient contaminés par les aflatoxines aux taux de 0,08 ppm et de 0,4 ppm.

d) Les haricots niébés (Vigna inguiculata) : 5 échantillons sur 20 présentaient des teneurs en flavotoxines variant de 0,03 à 0,30 ppm.

e) Les manioos et les patates douces : les échantillons analysés (tubercule-farine) ne contenaient pas d'aflatoxine; cependant l'examen des chromatogrammes en lumière ultra violette, révèle fréquemment un spot fluorescent bleu de rf inférieur à celui de l'Aflatoxine B1.



- Les extraits préparés à partir de ces échantillons n'entraînent aucune modification histologique du foie des canetons.

- Ce spot non identifié est comparé à celui fourni par la scopolétine en solution chloroformique; ils sont identiques et superposables; or, nous savons que la présence de scopolétine (6 méthoxyle - 7 hydroxyle coumarine) a été signalée par certains auteurs dans les patates douces parasitées par Cératocystis fimbriata.

CHAPITRE V

METABOLISME DES AFLATOXINES
INTERPRETATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

La connaissance de l'ensemble du métabolisme des aflatoxines est encore très incomplète.

- Nous savons toutefois que ces métabolites toxiques sont retrouvés, 30 minutes après leur ingestion, au niveau de la cellule hépatique (51). Au cours de leur transport sérique, ils sont vraisemblablement liés à des protéines (190).

- Nous avons voulu :

a) déterminer si la protéine support n'est point une fraction antigénique aspergillaire.

b) préciser le métabolisme général de l'aflatoxine chez le mammifère.

50 rats adultes Wistar Commentry ingérent, soit un tourteau contaminé par Aspergillus flavus (0,75 ppm d'aflatoxine) pendant 14 mois, soit une culture pure d'Aspergillus flavus ensemencée sur milieu de Brian liquide et recueillie après développement de 10 jours.

Les rats sont gavés à l'aide d'une seringue à embout métallique prolongé (longueur = 5 cm - diamètre = 2 mm). Ils reçoivent 5 ml de culture concentrée soit 5 mg environ d'aflatoxine kg/jour pendant 4 jours.

Urines et fèces sont récoltées dans les cages à métabolisme et conservées à - 20° c pour analyse. Le sang est prélevé par ponction retro-orbitaire (78) et collecté 30 mn, 1 h, 2 h, 6 h après le repas

toxique.

- Les prélèvements de foies sains, cancéreux, ou porteurs d'hépatite nécrosante, recueillis au cours de laparotomies exploratrices ou à l'autopsie, sont homogénéisés et concentrés 30 fois en solution de polyvinyl pyrrolidone à 40 % dans de l'eau distillée.

- Ces produits biologiques (sang, urines, selles, extraits hépatiques) susceptibles de contenir des antigènes aspergillaires et de l'aflatoxine sont étudiés :

1°) par la méthode d'Outcherlony de double diffusion en gélose (136) et par l'analyse immunolectrophorétique (75); ils sont confrontés à des immunséruns de lapins antifongiques obtenus par la technique de Neuhauss, Havez et Biserte (130); les antigènes utilisés pour l'immunisation sont préparés selon la méthode de Biguet et Coll (26, 27).

Ces sérums hypérimmuns produisent entre 14 et 17 arcs de précipitation avec les antigènes homologues.

2°) par les méthodes chromatographiques, notamment celle préconisée par Allcroft et Coll (8) pour l'extraction des aflatoxines des urines.

La méthode de de Iongh (57) est appliquée pour l'extraction du toxique dans le sang, les fèces et le parenchyme hépatique des animaux expérimentaux.

I - Résultats :

Métabolisme des aflatoxines

A - Recherche des fractions protéiques aspergillaires dans le sang des rats intoxiqués :

- Elle a été poursuivie chez les mammifères qui ingèrent une

culture d'Aspergillus flavus ou encore un régime contaminé par cette culture.

- Urines, fèces, sang, extraits hépatiques homogénéisés et concentrés des rats normaux ou porteurs d'hépatoxarcinomes, ne comportent jamais de fractions aspergillaires décelables par un immunsérum anti-aspergillus.

- La muqueuse gastro-intestinale du rat, saine - ou lésée avant tout gavage par une gastro-duodénite créée par l'ingestion de 3 comprimés d'aspirine jour/10 jours - semble une barrière que les fractions protéiques aspergillaires ne peuvent franchir.

En fait, les éléments solubles de la culture aspergillaire sont détruits par l'action simultanée de l'acidité gastrique et des sucs digestifs.

- L'antigène Aspergillus flavus (pH = 0,8) est mis en présence de concentrations croissantes d'acide chlorhydrique (temps de contact = 30 mn; pH de 6,2 à 2). Confronté à l'immunsérum homologue, les lignes de précipitation sont atténuées dès pH = 4, effacées à pH = 2.

- 330.000 unités S.T. de trypsine pure ont une action comparable sur l'antigène (temps de contact = 1 h°.)

La synergie d'action des deux substances fait pratiquement disparaître la réaction immunologique.

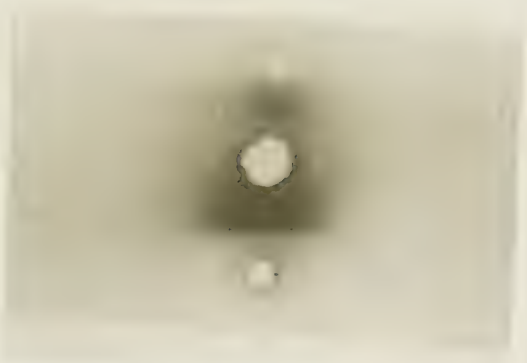


Fig. 1

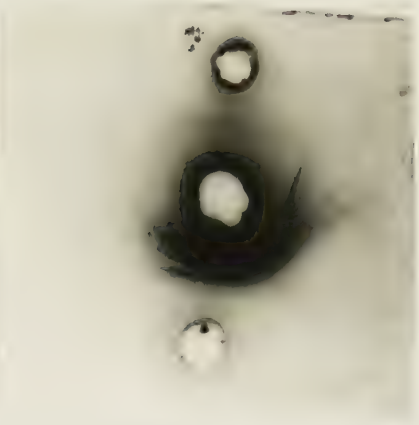


Fig. 2

Fig. 1. - Action de l'acidité sur l'antigène A. flavus.
Réservoir supérieur : A. flavus (pH = 2); central : antisérum de lapins antifongique; inférieur : Aspergillus flavus.

Fig. 2. - Action synergique de l'acidité et de la trypsine sur A. flavus.
Réservoir supérieur : A. flavus (pH = 2) et trypsine = 333.000 U.S.T.; central : antisérum de lapins antifongique; inférieur : A. flavus.

II - Recherche de l'aflatoxine :

Elle a été poursuivie chez les rongeurs qui ingèrent une culture d'Aspergillus flavus ou encore un régime contaminé par cette culture.

Les dosages chromatographiques révèlent la présence d'aflatoxines dans les urines et les selles des rats gavés de culture.

Les foies de ces rats renferment également de l'aflatoxine. Ce résultat confirme les découvertes de Butler et Coll (34) et de Clifford et Coll (91).

III - Interprétation et discussion :

Le métabolisme des aflatoxines pourrait se dérouler ainsi :

Le petit et le gros mammifère (rat, brebis, vache) ingérent un aliment souillé par une culture toxique d'Aspergillus flavus : le

support fongique disparaît rapidement, détruit par l'acidité gastrique et les sucs digestifs; les petites molécules d'aflatoxine s'éliminent :

a) par les urines ou les fèces sous forme d'aflatoxines B1, M1 *, G1 (7, 8, 90)

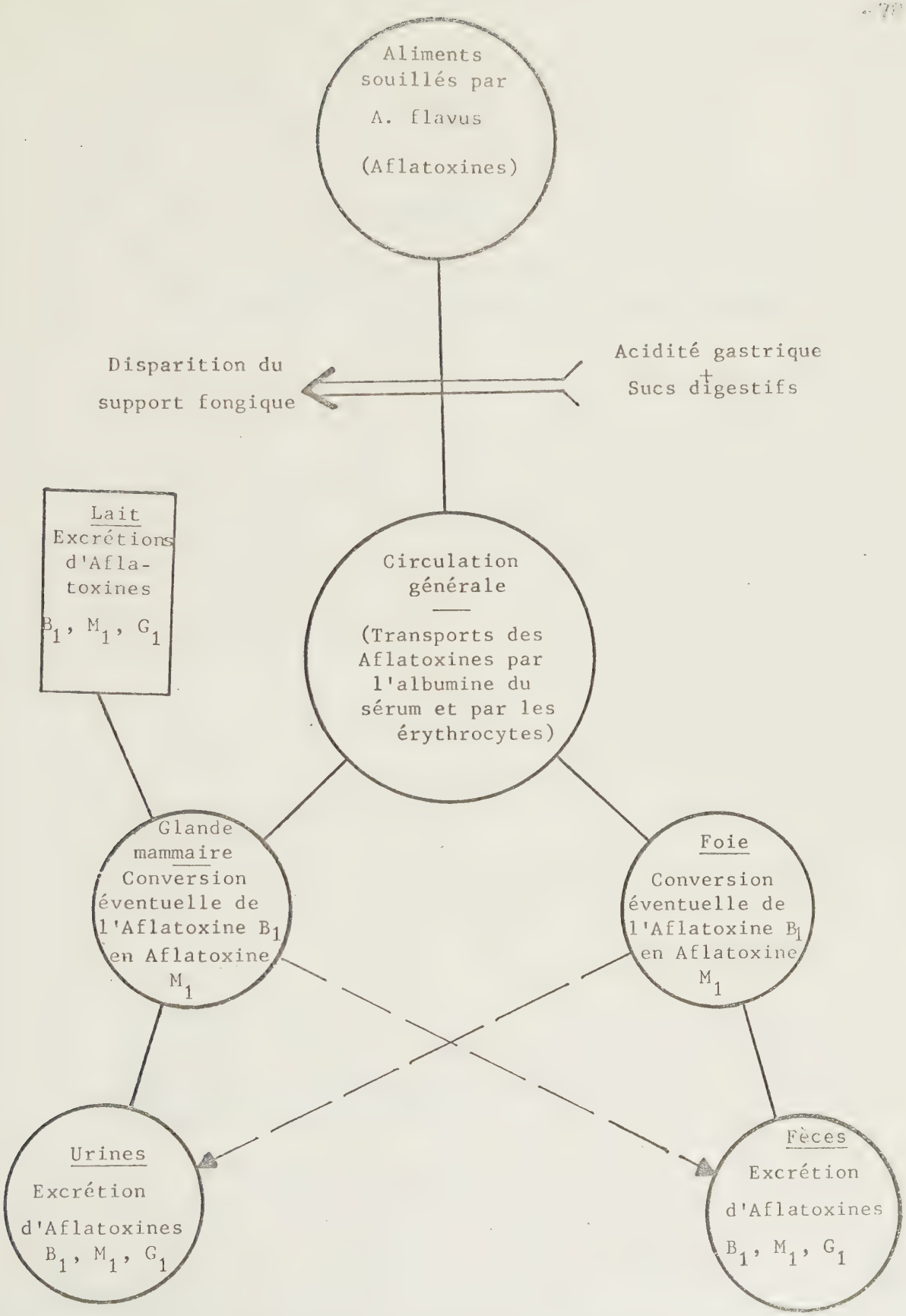
b) par le lait sous ces mêmes formes (8,94).

Elles pénetrent dans la circulation sanguine (34) pour se lier éventuellement à l'albumine du sérum (190), aux érythrocytes. Elles atteignent rapidement la circulation portale et la cellule hépatique (34, 51) et sontretrouvées au niveau de la glande mammaire (56).

La conversion de l'aflatoxine en ses métabolites au niveau de la muqueuse intestinale est incertaine, La conversion de l'aflatoxine B1 en aflatoxine M1 se ferait : soit au niveau du foie (34), soit au niveau de la glande mammaire (94).

Certaines observations précisent que la conversion de l'aflatoxine B1 en aflatoxine M1 est réelle; il existe cependant une part d'aflatoxine M1 préformée dans les concentrés imparfaitements purifiés de B1 injectables (113).

* Milk toxin



Métabolisme probable des aflatoxines.

CHAPITRE VI

LESIONS PARENCHYMATEUSES ET ALTERATIONS STATURO-PONDERALES DES CANETONS ET DES RATS PROVOQUES PAR LES AFLATOXINES

Dans la majorité des cas les tourteaux d'arachide, utilisés pour l'alimentation animale, résultent d'une pression des graines dans des expellers *. Une extraction seconde par solvant enlève la presque totalité de l'huile demeurée dans le tourteau gras sortant de la presse. Leur valeur alimentaire est intéressante. En effet les tourteaux d'arachide renferment 50 % de protéines (2) ; malheureusement leur qualité protidique assez moyenne limite leur utilisation dans le régime des monogastriques.

- Chez les ruminants le problème est très différent. Du fait de l'abondance des microorganismes dans les réservoirs gastriques, la fraction protéique du régime subit de profonds remaniements et la cellulose se trouve hydrolysée.

  C'est pourquoi l'arachide et ses sous-produits (foin, coque, pellicule (3) sont largement utilisés dans l'alimentation bovine.

- En France, le bétail dispose d'environ 400.000 t de tourteaux d'arachide par an.
  Alors qu'en Europe, les animaux reçoivent essentiellement des tourteaux, la plante entière et les sous-produits sont consommés dans les régions productrices.

* Presse travaillant en continu

Cette ressource végétale est donc d'un grand appoint pour l'alimentation des élevages.

Rappelons cependant que depuis la découverte des métabolites toxiques et cancérigènes des pollutions aspergillaires sur les arachides, une certaine inquiétude est apparue chez les éleveurs de volailles, porcs et ruminants, qui jusqu'àlors utilisaient les tourteaux d'arachide sans arrière pensée.

- Dans ce contexte, l'utilité de nos propres recherches est de contribuer à une meilleure connaissance de l' agressivité des aflatoxines sur les organismes animaux.

- Les méthodes d'évaluation de la toxicité ont déjà été énumérées. Rappelons qu'il s'agit principalement de dosages physicochimiques par chromatographie sur couche mince de Kieselgel G et de dosages biologiques sur caneton d'un jour (cf page 25 et 27).
En choisissant des ordres zoologiques aussi différents que les palmipèdes et les rongeurs (animaux tests des études toxicologiques (150)), nous avons voulu déterminer dans un travail statistique l'influence des aflatoxines sur le développement staturo-pondéral des animaux et son action spécifique au niveau des divers parenchymes.

Résultats :

I - LESIONS PARENCHYMATEUSES ET ALTERATIONS STATURO-PONDERALES DES CANETONS

- 200 jeunes canetons mâles et femelles Kaki Campbell, âgés de 24 à

48 heures, sont mis en expérimentation dès réception.

- Les jeunes palmipèdes sont logés par lots de vingt dans des couveuses de grandes dimensions, placées dans des locaux climatisés et éclairés. Canetons test et canetons témoins reçoivent un aliment commercial composé adapté à leur jeune âge.

La composition centésimale de cet aliment est la suivante :

. Farine de maïs	40
. Farine de poisson à 60 % de protéine	5
. Farine de soja à 50 % de protéine	10
. Issues de céréales	24,50
. Luzerne	4
. Avoine	10,45
. Sel	0,50
. Phosphates	1,30
. Calcaire	4
. Oligoéléments et vitamines	0,25

- Pour écarter toute éventualité de contamination accidentelle ce régime équilibré ne comporte jamais d'arachides, support particulièrement favorable au développement d'Aspergillus flavus et à l'élaboration de ses toxines. De plus il est toujours soumis à un contrôle préalable.
- Tout régime pollué par l'aflatoxine est rejeté.

- La farine de poisson de fabrication récente est soigneusement délipidée afin de ne plus renfermer d'acides gras polyinsaturés susceptibles de se transformer par oxydation en époxydes ou péroxydes toxiques et éventuellement cancérigènes.

Dès leur arrivée les canetons tests sont soumis au gavage et reçoivent 0,5 ml le premier jour, 1 ml les 2, 3 et 4ème jour d'un extrait toxique.

Cet extrait est obtenu d'une manière désormais classique que nous avons analysée au cours du chapître descriptif des différentes techniques proposées pour l'étude des aflatoxines (cf Chapître II, page 25)

L'extrait peut se préparer,comme nous l'avons dit, soit à partir de tourteaux d'arachide contaminés, soit à partir de cultures d'Aspergillus flavus.

L'utilisation des tourteaux garantit la fidélité et la reproductibilité des résultats, c'est-à-dire le décès du caneton dans un tableau clinique désormais classique.

Le caneton reçoit donc l'extrait pendant 4 jours.

Les examens, les résultats cliniques et histologiques sont colligés pendant 7 jours et comportent :

a) Courbe de croissance et courbe de mortalité :

L'aplatissement de la courbe de croissance n'est qu'un des témoignages de la toxicité d'un aliment souillé par Aspergillus flavus.

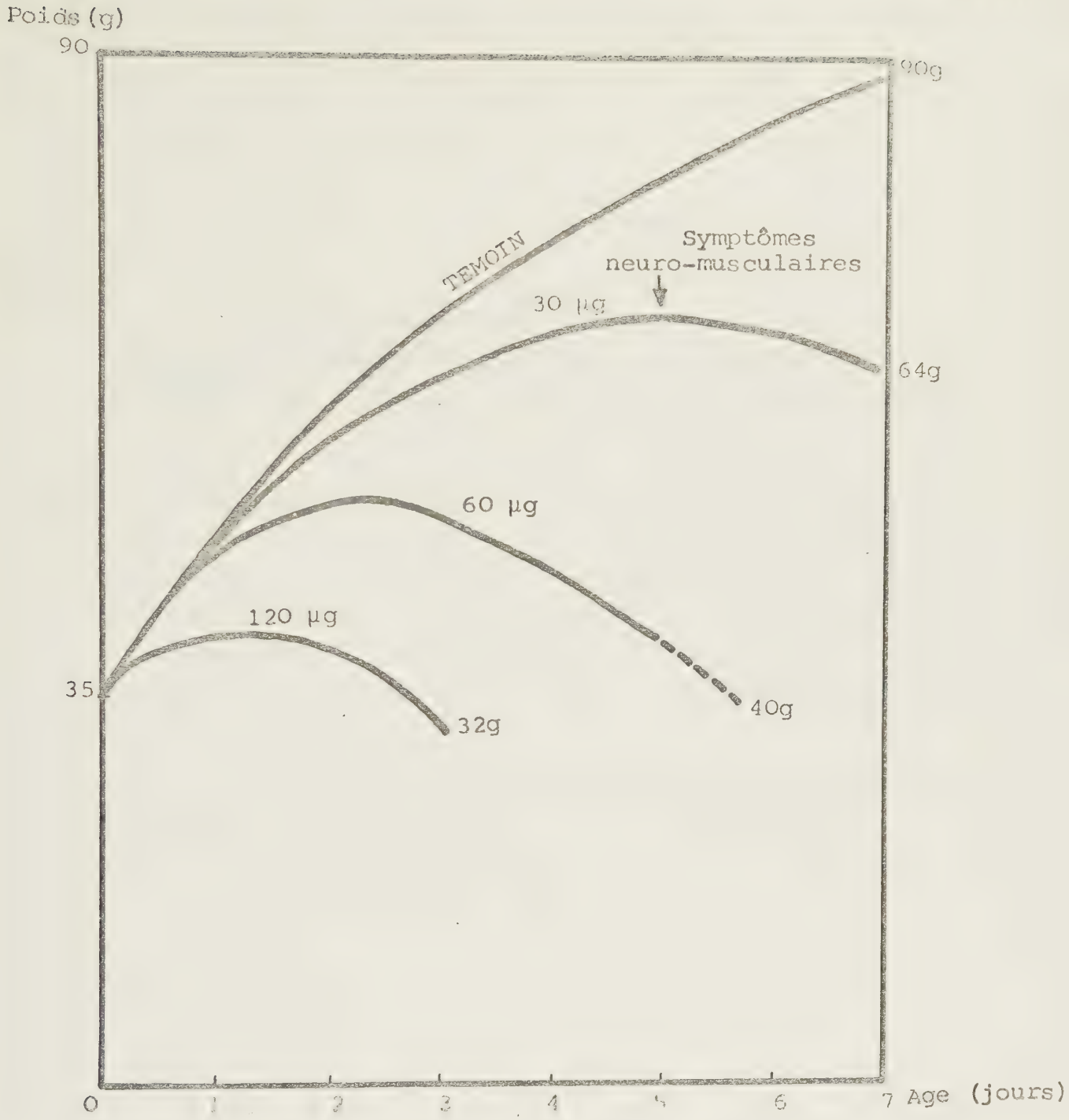
La mortalité des animaux reste toujours la meilleure preuve de la présence de l'agent léthal.

Nous retrouvons les résultats antérieurement signalés par Richir et Coll (151).

- mortalité maximale les 1er et 2ème jours de l'ingestion toxique, s'infléchissant ensuite, pour se relever au cours du 5ème jour.

- manifestations cliniques concomittantes comprenant : inappétence, déséquilibre neuro-musculaire à type de détente brutale des membres inférieurs ou encore, spasmes corporels avec hyper-extension brusque de la tête.

Si pour certains auteurs comme Sargeant et Coll (157) une dosetoxique de 20 microgrammes suffit à tuer un caneton de 24 heures, d'autres auteurs comme Nesbitt (129) estime la DL 50 à 60 microgrammes pour des animaux de même âge; d'autres encore, comme Richir et Coll (151) signalent un infléchissement de la courbe de croissance et une mortalité importante pour des doses journalières de 120 microgrammes. (~~cf Graphique page 83 bis~~).

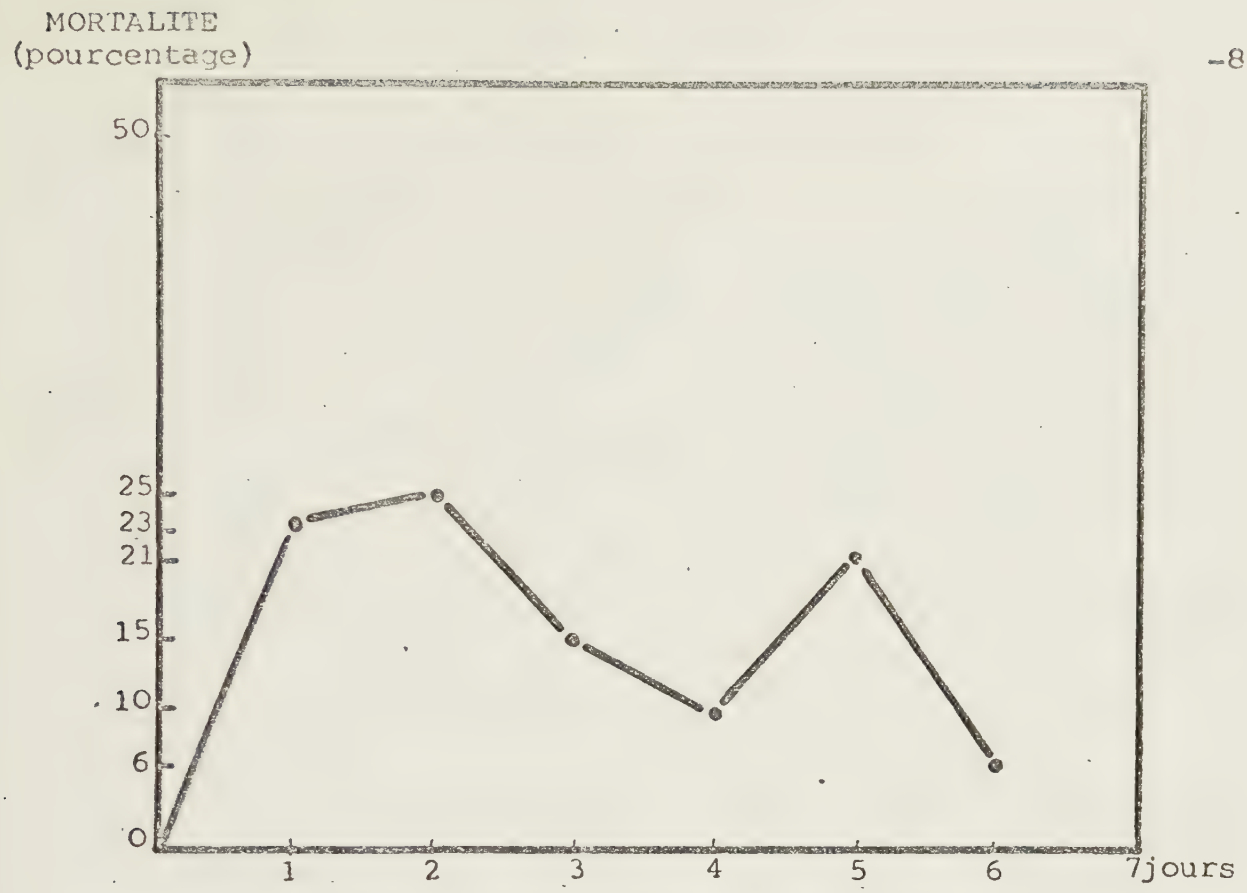


Variation du rythme de croissance pondérale des canetons en fonction de la dose d'aflatoxine ingérée.

La courbe de croissance varie donc en fonction de la dose toxique quotidienne ingérée par l'animal. La représentation graphique ~~suivante~~ précédente met en évidence ces variations. (cf Graphique page 84 bis).

Tous nos résultats corroborent ces données; mais plus que la notion de doses mortelles variables selon les séries de palmipèdes, variables aussi selon les individus composant ces séries, il faut retenir l'importance de la sommation réitérée des doses toxiques provoquant dans un premier temps une perte de l'appétit, puis une altération de la croissance et le décès de l'animal. (cf graphique p. 84 bis)

- L'analyse statistique des résultats, présentée sous forme de tableau, démontre encore l'action inhibitrice de l'aflatoxine sur la croissance pondérale de canetons soumis aux régimes contaminés pendant 7 jours.



Relation dose/léthalité des canetons intoxiqués par l'aflatoxine.
*Dose toxique quotidienne/caneton.

Régime	Nombre d'animaux	Poids initial moyen en (g)	Poids final moyen (g)	Croit moyen (g)	Valeur de t (I)
Aflatoxine	12	31,8	58,6	26,8	(+) 5,37
Témoins	5	27,8	85,2	57,4	
Aflatoxine	12	32,0	64,3	32,3	(=) 3,02
Témoins	4	33,3	86,8	53,5	
Aflatoxine	8	38,0	75,1	37,1	(+) 7,63
Témoins	6	37,5	103,2	65,7	

(I) - Valeur de t, établie selon la loi de Student-Fisher

(=) - Seuil de signification 0,01

(+) - Seuil de signification 0,001

Les différences de croît entre les séries ingérant le régime toxique et les séries témoins sont hautement significatives, respectivement, aux seuils de 0,01 et 0,001.

b) Bilan anatomopathologique des lésions hépatiques :

Un extrait toxique préparé à partir de quantités précises de régime contaminé comporte pour 4 ml d'extrait 30 γ d'aflatoxine. Cette dose toxique globale est ingérée par le caneton en 4 jours (7,5 γ d'aflatoxine/jour/caneton).

Les lésions hépatiques sont les plus communément rencontrées; elles sont pathognomoniques de l'action du toxique.

Les conclusions d'une étude comportant 2 lots de 100 canetons - l'un ingérant un régime toxique, l'autre recevant le même régime sans aflatoxine - fixent le poids moyen du foie du caneton à 2 g 947 pour l'animal intoxiqué et à 4 g 844 pour le témoin sain.

A l'autopsie le foie, réduit de volume, peut présenter des zones rose ou rouge franc sans localisation précises.

Le tissu hépatique, mou à la coupe, comporte fréquemment des lésions parcellaires hémorragiques ou biliaires.

C'est l'examen microscopique qui permet l'interprétation des lésions toxiques.
Il s'agit de phénomènes prolifératifs ou de nécrose :

- Les phénomènes prolifératifs cellulaires s'organisent autour de l'espace porte sous la forme d'une couronne cellulaire radiaire constituée d'éléments basophiles plus ou moins différenciés selon la quantité de toxine ingérée.

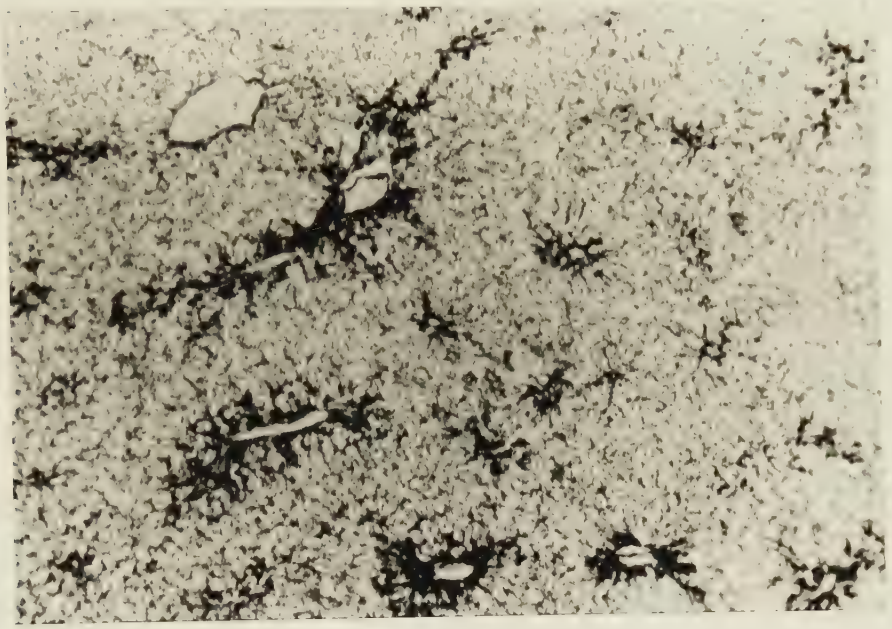
. En l'absence peu fréquente de prolifération périportale, certains auteurs comme Richir (151) font remarquer la présence de couronnes radiaires périportales en étoiles, dépourvues de lipides sur des coupes à congélation. Comme ces auteurs, nous pensons que les éléments délipidés correspondent aussi bien à la prolifération périportale qu'à des cellules denses de régénération; en l'absence de prolifération périportale ils signalent donc un processus de régénération cellulaire.

- La nécrose : associée ou non à la prolifération décrite, la nécrose parenchymateuse est le plus souvent mal systématisée; elle peut être complète ou incomplète et dans ce dernier cas les phénomènes régénératifs sont concomittants ou succédent au processus dégénératif.

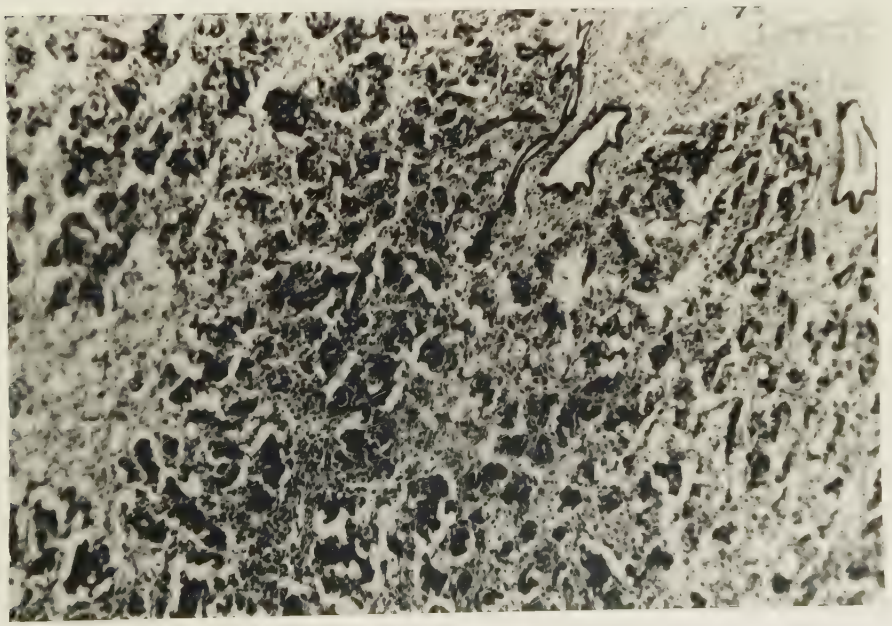
. Cette régénération prolifératives cellulaire est un processus constructeur qui doit être distingué, comme nous l'avons dit, de la prolifération cellulaire basophile provoquée par la toxicité du régime.

. Enfin, les colorants suivants : Noir Soudan, Orcéine permettent de mettre en évidence la modification, ou même l'absence, de la stéatose hépatique normale.

I - Prolifération biliaire périportale avec clarification et vacuolisation des hépatocytes chez le caneton



II - Nécrose hépatique extensive avec différenciation des hépatocytes chez le caneton



- Répercussion à long terme de l'intoxication aiguë : Il s'agit de canetons intoxiqués au cours des premiers jours suivant l'éclosion et ingérant ensuite une alimentation normale.

  . Ces canetons reçoivent l'extrait toxique pendant 7 jours (7,5 d'aflatoxine/jour/caneton). Ils vont subir un ralentissement de croissance prolongé, et il leur faudra environ 7 mois pour récupérer un poids normal dans les conditions expérimentales précitées.

  . Les résultats obtenus sont rapportés à un groupe de canetons témoins de même âge, recevant le régime normal "ad libitum".

Age (en jours)	Canetons témoins (poids en gr.)	Canetons ayant reçu dans les 7 premiers jours de leur vie un extrait toxique (aflat)
60	338	177
82	1.110	308
90	1.230	356
102	1.370	726
132	1.573	1.253
162	1.760	1.620
192	2.010	2.000

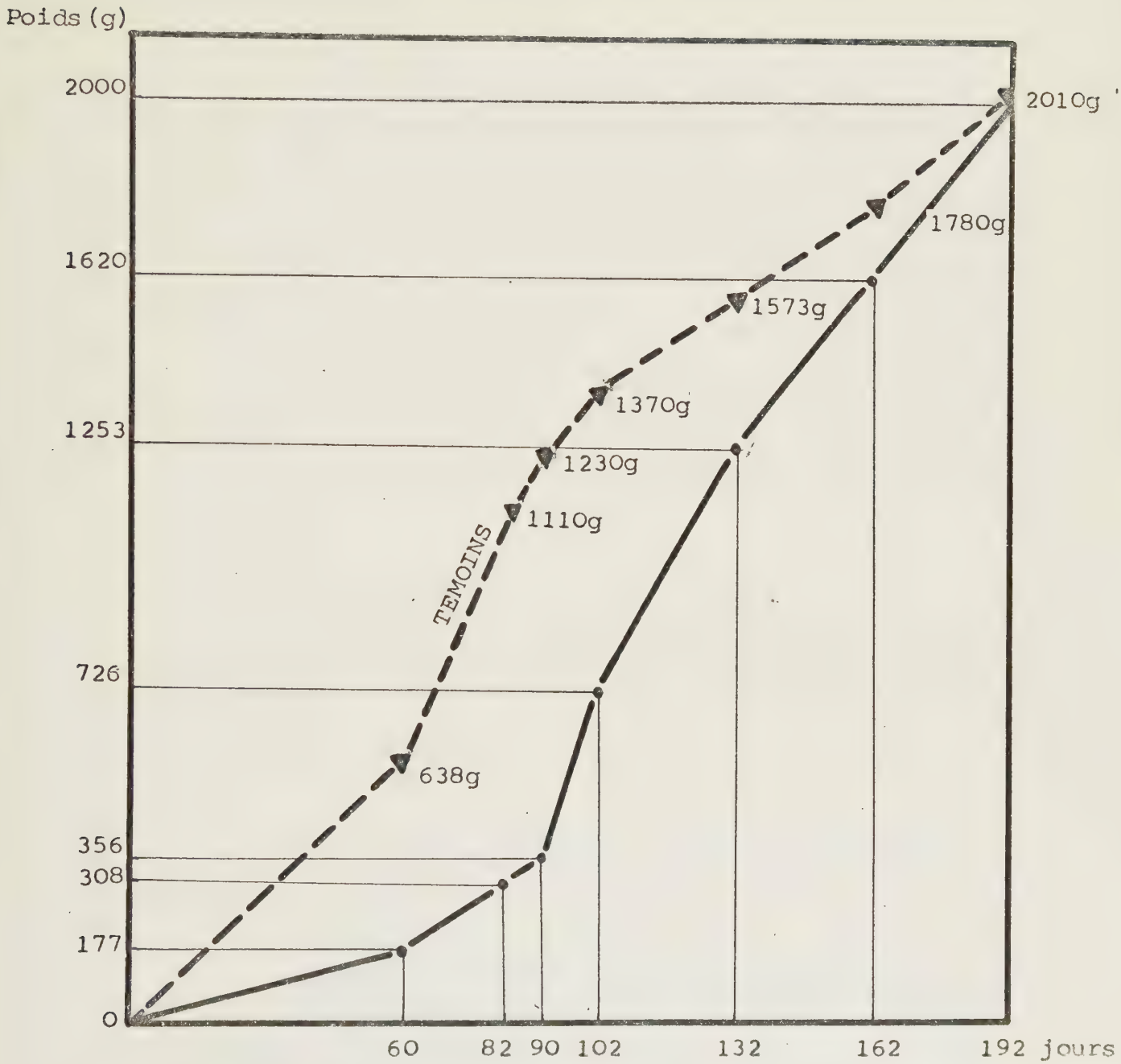
Ainsi la croissance des canetons témoins est rapide, harmonieuse, et sans bouleversement notable.

. La croissance des canetons soumis dans leur tout premier âge au régime toxique (aflatoxine) est très lente jusqu'au 3ème mois (première phase) très rapide au cours du 4ème mois (deuxième phase) régulière ensuite, jusqu'à atteindre le poids des animaux témoins au 7ème mois (troisième phase). (cf Graphique page 89 bis).

. Les lésions histologiques hépatiques rencontrées au cours de cette évolution ne présentent pas d'originalités majeures.

. Il s'agit initialement de nécrose localisée; les cellules hépatiques décrites en zone périnécrotique se différencient souvent par d'importantes anomalies cytonucléaires sans caractères évidents de malignité.

. Plus tard une fibrose périvasculaire, portale et centrolobulaire, apparaît; les lésions parenchymateuses alors s'effacent, la structure cellulaire se normalise.



Rythme comparé de croissance du caneton témoin et du caneton soumis à une intoxication aigue par 7,5µg d'aflatoxine/jour au cours des 7 jours faisant suite à l'éclosion.

II - LESIONS PARENCHYMATEUSES ET ALTERATIONS STATURO-PONDERALES DES RATS

- 400 rats mâles Wistar Commentry ingérent "ad libitum" et dès le sevrage un régime comprenant un aliment commercial mélangé à un tourteau d'arachide toxique.

- Ce tourteau préalablement ensemencé par A. flavus est ensuite traité comme celui qui a servi à nourrir les canetons.

- Le mélange aliment-tourteau contient 0,75 ppm d'aflatoxines.

- Il est cancérigène et peu toxique pour les rongeurs.

- Il comporte les quatre aflatoxines principales (B1, B2, G1, G2) dont les propriétés biologiques sont partiellement connues.

100 rats témoins reçoivent ce même régime commercial non contaminé.

- L'ensemble de l'élevage est placé dans des conditions d'hygiène rigoureuse, dans des locaux climatisés, périodiquement désinfectés et désinsectisés.

- L'ingestion chronique d'aflatoxine provoque :

1°) l'altération du développement staturo-pondéral des rongeurs.

- Comme nous le verrons au chapitre VII, les amaigrissements des rats

intoxiqués sont spectaculaires dès le 11ème mois d'expérimentation.

2°) L'apparition de lésions viscérales évolutives et de tumeurs malignes parenchymateuses.

A - Lésions hépatiques :

. Selon les séries 60 à 90 % des rats soumis à l'intoxication par les aflatoxines sont porteurs d'un cancer primitif du foie.

. Ces tumeurs coéxistent parfois avec d'autres lésions non tumorales d'interprétation plus délicate.

1 - les cancers hépatiques :

. Ils sont généralement multinodulaires.

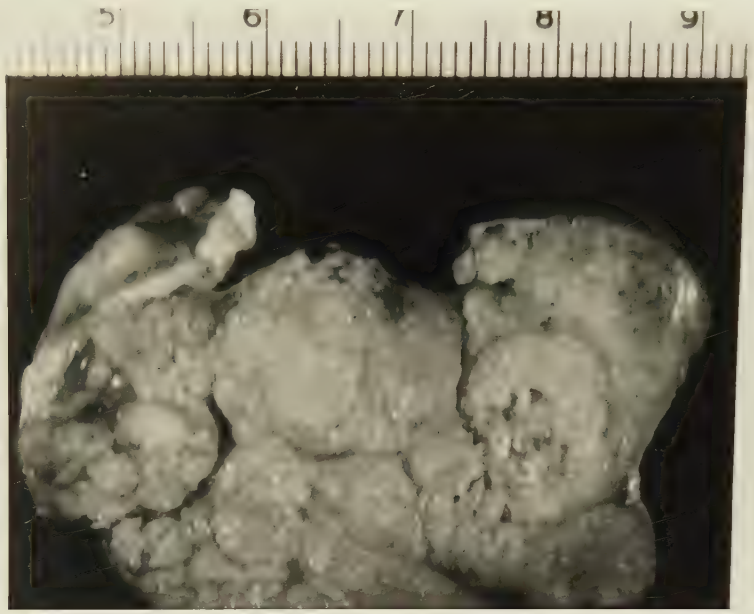
. Un foyer tumoral unique, isolé, volumineux, comparable à la forme massive des cancers primitifs humains, peut coloniser le lobe droit.

. Les éléments tumoraux sont apparents ou plus rarement microscopiques.

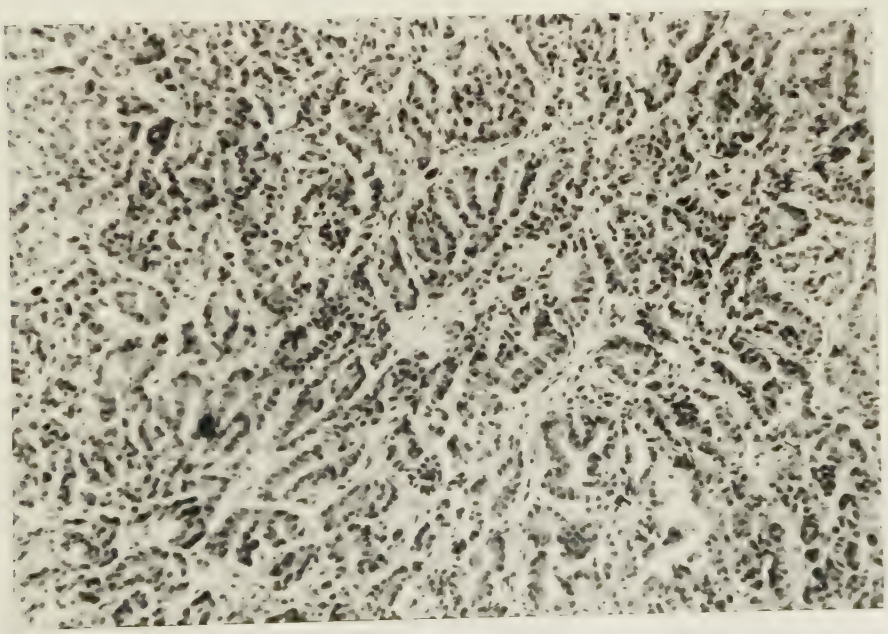
. Sur le plan histologique 6 fois sur 9 ces cancers sont des carcinomes hépatocellulaires trabéculaires ou massifs, souvent très différenciés.

. Les rares formes cholangiocellulaires trabéculaires ou papillairés se développent - comme les cancers humains - au sein d'une stroma réaction fibreuse importante.

III - Cancer primitif du foie du rat - Noter la lobulation par confluence des foyers cancéreux initialement séparés



IV - Carninome de type cholangiocellulaire chez le rat



2 - les lésions associées :

a) la fibrose

. L'association cancer-cirrhose paraît exceptionnelle. (1 % des cas étudiés).

. Au voisinage des lésions il n'est pas rare de rencontrer des foyers de fibrose dense souvent extensive; ces foyers se situent plutôt au niveau des espaces portobiliaires mais parfois en plein parenchyme hépatique.

. La sclérose intralobulaire est exceptionnelle, tout au plus peut-on noter une majoration de la trame réticulinique avec tendance à la collagénisation.

b) les nodules d'adénomatose et de régénération

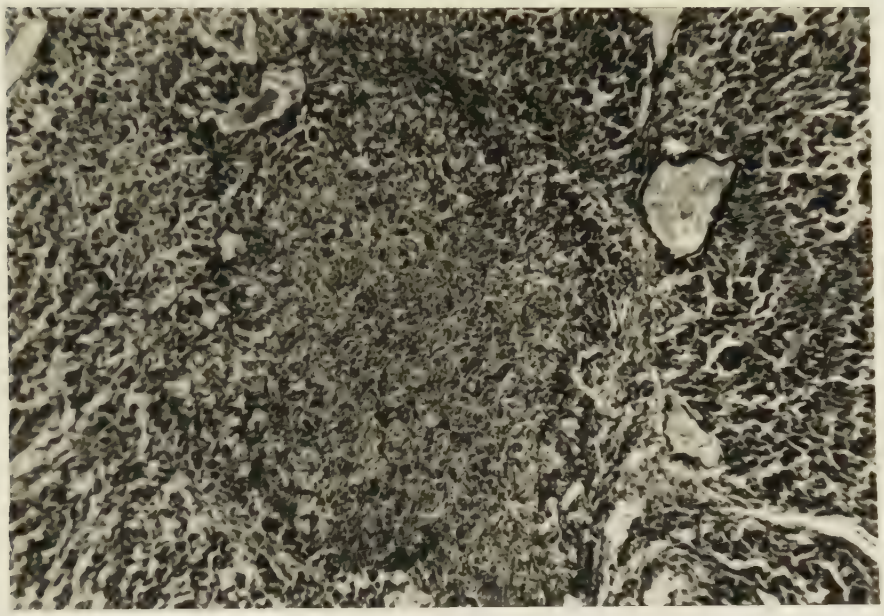
. Associés ou non à la prolifération cancéreuse, de petits nodules adénomateux dépourvus d'espaces portes se développent dans le parenchyme. Leurs travées anarchiques sont constituées soit d'hépatocytes volumineux à cytoplasme clair, soit de petites cellules à cytoplasme basophile.

. La présence d'anomalies cytonucléaires caractérise certains nodules souvent considérés comme d'authentiques foyers carcinomateux microscopiques.

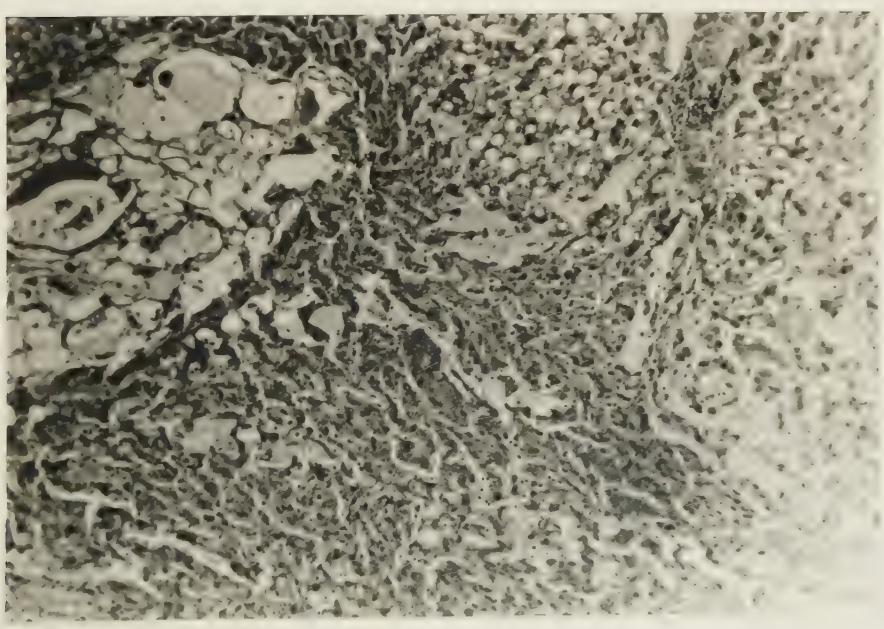
c) l'adénofibromatose biliaire kystique

. Cette lésion quasi constante se développe sans spécifité aussi bien dans les foies cancéreux que dans les foies non cancéreux.

V - Au centre hyperplasie nodulaire régénérative difficile parfois à distinguer d'un nodule cancéreux



VI - En haut, à droite, lésions de stéatose
En haut, à gauche, lésions d'adénofibromatose



. Il s'agit de foyers nodulaires constitués de canaux biliaires dilatés et kystiques; leur lumière est libre, rarement encombrée d'un magma mal caractérisé par les colorants acides.

d) les foyers de prolifération biliaire

. Similaires aux proliférations reconnues dans le parenchyme du caneton soumis au toxique, les lésions sont localisées à la périphérie des espaces portes; elles s'étendent parfois et occupent la majeure partie du lobule hépatique.

. L'espace porte s'entoure d'une couronne cellulaire radiaire. Du point de vue cytologique, cette prolifération est formée de petites cellules basophiles de type biliaire, disposées soit en cordons, soit en formations acineuses.

. Ces éléments basophiles sont dépourvus d'anomalies cytonucléaires. Entre l'hépatocyte normal et l'élément type de cette prolifération toutes les transitions s'observent; la lésion paraît donc correspondre à une dédifférenciation des cellules hépatiques.

e) les lésions dégénératives et nécrotiques

. Des aires de nécrose discrètes ou étendues parsèment fréquemment le parenchyme.

. Des lésions de stéatose apparaissent à l'entour.

. La cellule hépatique lésée présente des anomalies : anisocaryose, anisocytose, vacuolisation cellulaire...

f) les infiltrats inflammatoires

. Homogènes, ils sont essentiellement localisés à la périphérie des espaces portobiliaires.

B - Lésions extrahépatiques :

a) lésions pulmonaires

. Des métastases nodulaires parsèment le parenchyme pulmonaire de 8 % des animaux.

. Les carcinomes hépatocellulaires sont à l'origine de ces métastases.

. Des lésions pulmonaires non spécifiques - foyers de broncho-pneumonie, de pneumonie, d'oedème, d'hémorragies, des lésions de type tuberculoïde - accompagnent fréquemment les métastases.

b) lésions gastriques

. Une hyperplasie papillomateuse, des ulcérations, des suffusions hémorragiques sont observées au niveau de la portion épidermoïde de l'estomac de 6 % des

rongeurs selon les séries autopsiées.

c) lésions rénales

. Les métastases rénales sont exceptionnelles (de 0,5 à 1 %) nous avons constaté la métastase rénale d'un carcinome hépatocellulaire et celle d'un carcinome cholangiocellulaire.

. De gros nodules adénomateux éosinophiles encombraient le parenchyme rénal d'un rat.

. Une fibrose interstitielle disséminée, souvent épaisse - avec ou sans infiltrats cellulaires associés, avec ou sans phénomènes congestifs concomittants - peut disséquer le parenchyme.

d) lésions mésentériques et péritonéales

. La greffe mésentérique d'un carcinome hépatocellulaire est une curiosité d'autopsie.

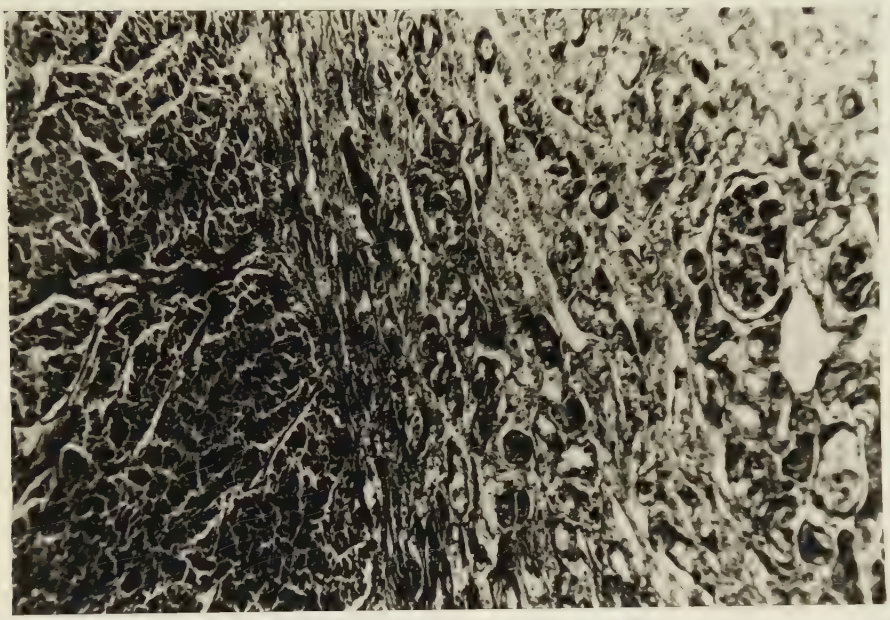
e) lésions des tissus mésenchymateux

. Elles sont exceptionnelles; un volumineux sarcome fusocellulaire sous-cutanée, est décelé au cou d'un rat.

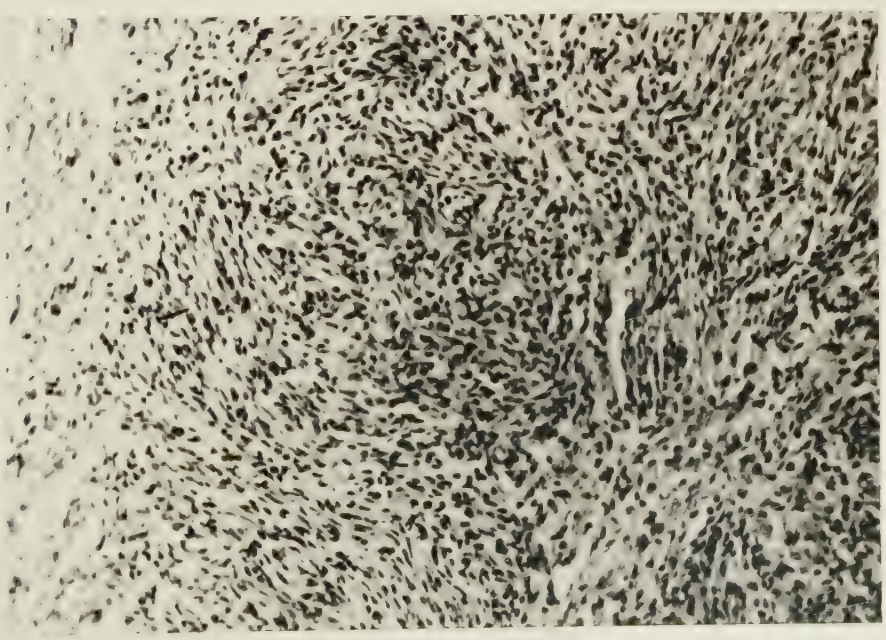
f) lésions des glandes salivaires

. Deux animaux sont porteurs d'adénocarcinomes glandulaires massifs des glandes salivaires sous-maxillaires.

VII – Métastase rénale d'un carcinome hépatocellulaire chez le rat



VIII – Sarcome fuso-cellulaire observé chez le rat



g) lésions testiculaires

. Chez 10 à 20 % des rats les altérations de la gonade sont caractéristiques :

- persistance d'un état embryonnaire du testicule
- atrophie avec régression de toute la lignée germinale et prolifération sertolienne.
- raréfaction considérable des cellules interstitielles de la glande endocrine.

Cette étude confirme donc :

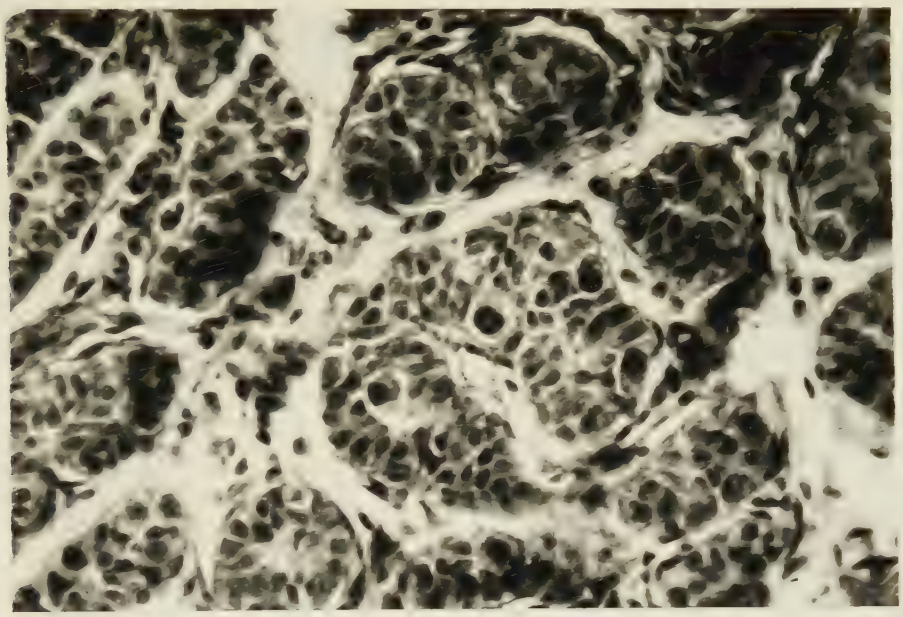
1°) - le pouvoir cancérigène de l'aflatoxine
Le cancer hépatique est fréquent.
Deux fois sur trois il s'agit de carcinome hépatocellulaire.
Les métastases éventuelles sont pulmonaires et rénales, exceptionnellement mésentériques.
- Rarement le cancer est associé à des lésions de cirrhose de type post-nécrotique.

2°) - L'existence de cancers extrahépatiques : adénocarcinomes glandulaires des glandes salivaires et sarcomes fusocellulaires sous-cutanés.

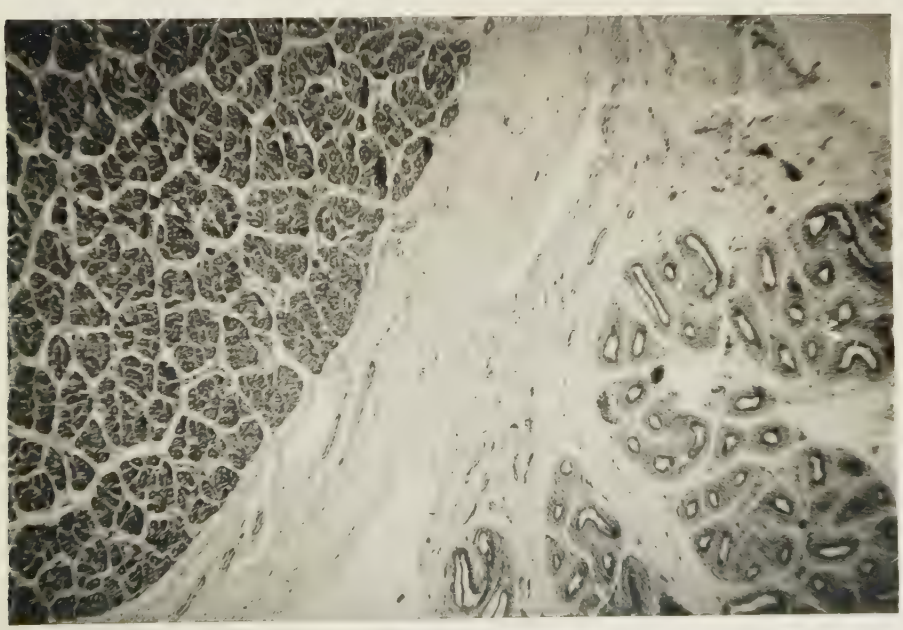
3°) - La présence de lésions adénomateuses, fréquentes au niveau du foie, exceptionnelles au niveau du rein.

4°) - L'importance des lésions non tumorales, l'atrophie testiculaire notamment, mais aussi les phénomènes dégénératifs et nécrotiques de la glande hépatique.

IX - Atrophie testiculaire
On voit un tube séminipare dépourvu de spermatozoïdes mais possédant quelques rares gonies. Il n'existe pas de cellules de Leydig typiques



X - A gauche, testicule de type embryonnaire
A droite, canaux épididymaires sans spermatozoïdes



- Interprétation et Commentaires :

Il faut tenir compte dans l'interprétation de ces résultats

1°) - de l'âge des animaux

. Ainsi les substances cancérigènes, notamment l'aflatoxine, sont particulièrement agressives lorsqu'elles sont introduites dans des organismes jeunes.

. On sait que la DL 50 est de 18 mg d'aflatoxine par kilogramme de poids vif pour le rat adulte.

. Elle n'est que de 1 mg/kg pour le rat nouveau né (200).

. Les aflatoxines seraient donc 18 fois plus actives chez le jeune rat.

2°) - de la composition du régime alimentaire

. Un animal malnutri, en état de sous nutrition azotée, est particulièrement sensible à l'agressivité toxique.

. Si un rat reçoit 50 ug d'aflatoxine/jour et un régime à 4 % de caseine, il devient porteur de lésions hépatiques sévères.

. Un rat homologue qui reçoit la même dose toxique mais un régime à 20 % de caseine est porteur de lésions bénignes (115).

3°) - de l'apport toxique

. Un tourteau, un aliment contaminé par Aspergillus flavus, comportent les aflatoxines et leurs métabolites.

. Une telle contamination peut-être retrouvée dans une alimentation traditionnelle (177).

. Certains auteurs préfèrent utiliser telle ou telle Aflatoxine cristallisée et purifiée, pour prévoir le niveau de toxicité du cancérigène.

4°) - de l'espèce animale expérimentale :

. Ainsi la sensibilité des oiseaux aux aflatoxines est exceptionnelle Le rat est déjà 10 à 20 fois plus résistant que le caneton à l'agression toxique (46).

- En tenant compte de ces 4 facteurs de variation dans l'interprétation des résultats, nous pouvons conclure que les aflatoxines provoquent chez les animaux étudiés des processus de nécrose, des lésions dystrophiques et des lésions tumorales.

Toutes ces constations présentent l'intérêt majeur de caractériser la virulence de l'aflatoxine.

CHAPITRE VII

APPLICATION DES REACTIONS D'HEMAGGLUTINATION-INHIBITION A L''ETUDE DES NECROSES HEPATIQUES INDUITES PAR LES AFLATOXINES

Comme nous l'avons vu, l'aflatoxine est à la fois toxique et cancérigène. Bien plus cancérigène que les substances chimiques les plus agressives. Ainsi, des doses quotidiennes de 9 mg de jaune de beurre, des doses journalières de 0,75 mg de diméthylnitrosamine distribuées au rat pendant un an, provoquent l'apparition d'un cancer du foie.

Il est prouvé depuis peu, qu'un ingéré total inférieur à 1 mg d'aflatoxines peut induire le développement d'un hépatocarcinome (71). La nécrose est le plus souvent concomittante.

Nous avons voulu déterminer, au cours des processus de destruction ou de cancérisation de la cellule hépatique :

a) la présence éventuelle d'antigènes hépato-cellulaires circulants dans le sérum des animaux intoxiqués.

b) les délais d'apparition de ces antigènes en fonction de la dose toxique ingérée.

c) la contribution de l'étendue des nécroses, le rôle du type histologique de la tumeur, dans la permanence des antigènes décelés.

120 rats mâles Wistar W.A.G. sont divisés en 3 lots de 40 sujets expérimentaux. Dès le sevrage, chaque lot reçoit respectivement un

régime renfermant 0,75, 1 et 1,5 ppm d'aflatoxines.

Un lot témoin de 50 animaux consomme le même aliment commercial non contaminé.

Les modalités techniques d'obtention des divers réactifs nécessaires aux réactions d'hémagglutination-inhibition ont déjà été précisées (

Les diverses méthodes de réactions sont également bien connues (

Parmi les résultats obtenus il faut souligner :

A - <u>La diversité des lésions hépatiques décelées au cours de l'intoxication chronique, et notamment</u> :

La rareté des nécroses parenchymateuses pendant 4 mois, quelle que soit la teneur en aflatoxines du régime ingéré (0,75 ppm, 1 ppm, 1,50 ppm).

Cette nécrose exceptionnelle est rencontrée à l'autopsie de deux rats intoxiqués seulement.

La pérennité de la nécrose dès le 7ème mois d'intoxication et son importance au cours du processus tumoral cancéreux.

Nous savons par contre qu'au cours de l'intoxication aigue, provoquée par d'autres hépatotoxiques, la nécrose peut être rapide. Ainsi de jeunes rats qui reçoivent une injection de $CdSO_4$ * constituent

* 1 mg/kg par voie intrapéritonéale

une nécrose hépatique dès la 15ème heure. Elle paraît majeure vers la 35ème heure. Une semaine plus tard, la lésion pratiquement disparue est encombrée de cellules monocluées.

B - L'intérêt des réactions d'hémagglutination-inhibition pour la mise en évidence des nécroses :

Le sérum des rats qui constituent une nécrose d'origine toxique, comporte des antigènes hépatocellulaires.

a) Temps d'apparition des antigènes hépatocellulaires :

- Un premier tableau rapporte la précocité d'apparition des fractions antigéniques dans le sérum des animaux qui ingérent un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines. (cf Tableaux I, page 102).

- L'estimation des résultats dépend de la technique utilisée et surtout de la sensibilisation des hématies.

La lecture des hémagglutinations s'effectue 1 heure, 3 heures et 12 heures, après le début de la réaction développée dans des tubes à fond rond (10/100 mm).

A une réaction : ++++ correspond une agglutination massive et épaisse
+++ des aggrégats cellulaires compacts, concentrés sur le fond des tubes
++ des aggrégats légers localisés sur toute l'étendue du fond
+ des agglutinats éparpillés encerclant parfois un dépôt cellulaire central concentré

APPARITION DE L'HYPOCHROMIE SUR LES HEMATIES AU COURS DE LA CULTURE (20 HEURES - EXPERIENCE D'APRES)

TEMPS	1	1 HEURE	2	3 HEURES	4	5	7 HEURES	9	11	14
Hématies tannées	0	1	2	4	5	6	7	7	7	8
Hématies formolées et tannées	0	1	2	3	5	6	7	8	9	10
Hématies tannées +DDB	0	3	4	6	7	8	9	11	12	12
Hématies + Solution de glutaraldéhyde	0	2	4	6	9	10	12	12	14	14

TABLEAU I

± de fins anneaux de particules, périphériques mal déssinés.

Les résultats sont indiscutables dès la cotation ++.

La substitution aux antigènes hépatocellulaires normaux d'antigènes hépatocellulaires cancéreux pour la sensibilisation des hématies, ou encore, la substitution d'immunsérums antifoie de rat cancéreux aux immunsérums antifoie de rat normal ne provoquent pas de modifications significatives des réactions d'hémagglutination.

- Nous rappelons que ces réactions peuvent décèler la présence de fractions hépatiques sériques, dès la 30ème heure après l'injection de CdSO4.

b) Taux sérique des antigènes hépatocellulaires au cours de l'intoxication chronique par les aflatoxines :

Les régimes utilisés sont contaminés à 0,75 ppm d'aflatoxines.

Le sérum des rats est prélevé chaque mois; les antigènes peuvent être décelés juqu'aux dilutions suivantes (cf Tableau II, page 104)

- 15 animaux de cette série sont porteurs d'hépatocarcinomes. Le foie de 5 rats ne comporte que des lésions banales de nécrose.

- La différence du taux sérique des antigènes hépatocellulaires entre les deux séries de rats appariés-cancéreux et non

PRESENCE DES ANTIGENES HEPATOCELLULAIRES AU COURS DE L'INTOXICATION CHRONIQUE
- 20 ANIMAUX - (REGIME à 0,75 ppm d'AFLATOXINES)

TEMPS	1 MOIS	2 MOIS	3 MOIS	4 MOIS	5 MOIS	7 MOIS	9 MOIS	12MOIS
Hématies tannées	1/20	1/20	1/40	1/40	1/40	1/80	1/80	1/80
Hématies formolées et tannées	1/20	1/20	1/40	1/40	1/40	1/80	1/160	1/160
Hématies tannées + B.D.B.	1/40	1/40	1/80	1/80	1/160	1/160	1/320	1/320
Hématies + solution aqueuse de glutaraldéhyde	1/80	1/80	1/160	1/320	1/320	1/640	1/640	1/640

TABLEAU II

cancéreux - n'est pas significative.

- Ainsi le taux des antigènes circulants ne paraît pas proportionnel à la malignité de la lésion.

- Au cours de l'intoxication aigue provoquée par le sulfate de Cadmium, et 36 heures après l'injection toxique, les fractions hépatiques sériques sont décelées par la technique d'hémagglutination la plus sensible, jusqu'à la dilution 1/640.

c) Délai d'apparition des antigènes hépatocellulaires sériques en fonction de la dose toxique ingérée :

- Les antigènes sont présents dès le 1er mois d'intoxication dans le sérum des rats qui ingérent un régime à 1 ppm d'aflatoxines. Les concentrations sériques relevées correspondent aux concentrations rapportées pour les animaux des séries précédentes.

- Les régimes concentrés - à 1,5 ppm - apparaissent plus agressifs! 20 rats sont utilisés pour l'expérimentation et chaque mois, les sérums des rongeurs qui comportent des fractions hépatocellulaires sont dénombrés. (cf Tableau III page 102).

- Dès le 4ème mois d'intoxication, la majorité des sérums investigués contiennent des fractions hépatocellulaires.

- Au 6ème mois une hécatombe d'origine infectieuse décime l'élevage, mais 50 % ou 70 % des sérums des animaux survivants - selon la technique d'hémagglutination utilisée - comportent les antigènes

SERUMS DE RATS COMPORTANT DES FRACTIONS HEPATIQUES AU COURS DE L'INTOXICATION CHRONIQUE - 20 ANIMAUX - REGIME A 1,5 PPM D'AFLATOXINE								
TEMPS	1 MOIS	2 MOIS	3 MOIS	4 MOIS	5 MOIS	6 MOIS	7 MOIS	8 MOIS
Hématies tannées	2	6	8	9	10	10		
Hématies formolées et tannées	2	6	8	10	10	10		
Hématies tannées + B.D.B.	3	7	9	10	11	12		
Hématies + solution aqueuse de glutaraldehyde	4	8	10	12	14	14		

TABLEAU III

recherchés. Ils sont décelés jusqu'au titre 1/1280, par la méthode des hématies sensibilisées par la glutaraldéhyde.

d) Corrélation nécrose hépatique histologique - antigènes hépatocellulaires sériques :

La concentration de ces antigènes paraît assez régulièrement proportionnelle à l'étendue des lésions nécrotiques décelées. (cf Tableau IV, page 108).

La nécrose est codifiée +, ++, +++, ++++ selon l'importance de la lésion parenchymateuse observée. Quelques résultats discordants dans cette corrélation ne peuvent être expliqués.

e) Recherche des auto-anticorps antifractions hépatiques circulantes

30 rats ingèrent pendant 10 mois un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines. Leurs sérums sont étudiés par les techniques d'hémagglutination directe classiques. Deux comportent des anticorps qui peuvent agglutiner les hématies couplées - sensibilisées par l'acide tannique ou par la glutaraldéhyde - aux antigènes hépatocellulaires. Les titres d'hémagglutination s'élèvent jusqu'au 1/160ème.

DISCUSSION DES RESULTATS

Il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats :

I - du type d'intoxication provoquée :

NÉCROSE HÉPATIQUE	ANTIGÈNES HÉPATOCELLULAIRES DÉCELÉS AUX DILUTIONS
+	$\frac{1}{40}$
+ +	$\frac{1}{160}$
+ + +	$\frac{1}{160}$ - $\frac{1}{320}$
+ + + +	$\frac{1}{640}$

1) - Lorsqu'il s'agit d'une intoxication aigue au CdSO4 la nécrose hépatique est décelée 24 heures après l'injection toxique.
- Les antigènes hépatocellulaires sériques sont identifiés à la 30ème-40ème heure, jusqu'au taux de dilution 1/640.

2) - Lorsqu'il s'agit d'une intoxication chronique déterminée par les aflatoxines :

a) il existe des fractions hépatiques circulantes dans le sang des rats agressés. Ces fractions sont décelées jusqu'au taux de dilution sérique : 1/640 lorsque l'animal ingère un régime à 0,75 ppm d'aflatoxines et jusqu'au taux de dilution : 1/1280 lorsque le régime est contaminé à 1,5 ppm.

b) la nécrose est une manifestation tardive de la toxicité.

. Au cours du 1er mois d'intoxication - et quel que soit la teneur de l'aliment en aflatoxines (0,75, 1 ou 1,5 ppm) - l'apparition des antigènes hépatocellulaires dans la circulation sanguine est exceptionnelle.

. Au 6ème mois les fractions protéiques sont reconnues dans le sérum de 70 % des rats qui ingèrent le régime contaminé à 1,50 ppm d'aflatoxines. Elles sont décelées jusqu'au taux de dilution sérique : 1/1280.

. Si l'alimentation proposée contient 0,75 ppm d'aflatoxines c'est au 14ème mois d'expérimentation que le sang de 70 % des rats comporte une teneur élevée en antigènes. Ils sont identifiés jusqu'aux taux de dilution : 1/640.

. En règle générale, plus le régime est toxique, plus l'apparition des fractions cellulaires dans le sang circulant est rapide et plus leur concentration est élevée.

c) la concentration sérique en antigènes hépatiques est grossièrement proportionnelle à l'importance de la nécrose cellulaire.

. Il faut préciser cependant que la lésion histologique est une découverte tardive d'autopsie.

. Au 1er mois d'ingestion toxique (régime à 1,5 ppm d'aflatoxines) 20 % des sérums contiennent les antigènes; la lésion nécrotique n'est pas décelée.

. Elle est constituée au 3ème mois d'agression où déjà 50 % des ponctions sanguines comportent les fractions recherchées.

d) 75 % des animaux constituent des carcinomes hépatocellulaires ou cholangiocellulaires caractéristiques, dès le 12ème mois d'intoxication.

. La pérennité de la tumeur n'entraîne pas l'augmentation significative du taux des protéines sériques d'origine hépatique.

e) la présence des auto-anticorps antifractions hépatiques circulantes est exceptionnelle.

. Il semble exister une immunotolérance; les complexes protéiques issus du foie de l'animal sont dépourvus d'activité antigénique au cours de leur circulation sanguine. Leur structure n'est pas assez modifiée par l'agression toxique pour induire la formation d'anticorps.

. Ces observations corroborent les résultats de travaux similaires (85, 86).

. Certains auteurs, utilisant la réaction de fixation du complément, décèlent la présence d'autoanticorps sériques au cours des intoxications hépatiques aigues (193, 194).

. La réaction de fixation du complément est discutée (95); elle reste, selon Ishizaka (95), une méthode imprécise et peu spécifique pour identifier la réaction antigène-anticorps. Mieux vaut utiliser les réactions classiques d'hémagglutination directe.

Le sérum des rats consommateurs d'aflatoxines ne comporte donc pas d'autoanticorps. Par contre, rares sont les sangs des rongeurs, porteurs de foie nécrotique, qui ne contiennent des antigènes hépatocellulaires.

Ainsi du stade d'évolution, de l'étendue, du nombre des localisations des lésions, pourraient dépendre la concentration des fractions hépatiques charriées dans la circulation.

II - de la méthode utilisée :

Ces fractions sont décelées par les techniques d'hémagglutination-inhibition. Certaines réactions (hématies tannées, hématies formolées et tannées...) ne sont pas satisfaisantes - Peu fidèles, car difficilement reproductibles, leur réalisation est délicate - Enfin la lecture des hémagglutinations est souvent malaisée.

Nous recommandons la méthode des érythrocytes couplés à la glutaraldéhyde; plus rapide, plus spécifique, elle renseigne mieux sur la teneur en antigènes sériques circulants, des rats intoxiqués.

CHAPITRE VIII

L'INFLUENCE DE L'AFLATOXINE DANS LA SYNTHESE PROTEIQUE DU RAT

L'intoxication chronique non léthale du rat - accompagnée ou non de cancérisation hépatique - provoque une perte de poids de l'animal, mais le mécanisme complexe d'apparition de cette altération staturo-pondérale est mal connu.

Ce travail a pour but d'étudier :

1 - La réalité statistique des amaigrissements survenus dans les différents groupes de rats expérimentaux.

2 - Les perturbations éventuelles du métabolisme protéique, cause essentielle ou annexe des altérations staturo-pondérales.

3 - L'intérêt des méthodes associées, immunochimiques et biochimiques, dans la compréhension du mécanisme d'action des substances toxiques et cancérigènes.

I - APPARITION DES AMAIGRISSEMENTS

30 rats mâles Wistar Commentry âgés de 11 mois ingérent depuis le sevrage un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines totales.

30 rats Wistar de même âge et de même sexe reçoivent le même régime non contaminé.

L'analyse statistique des résultats au 11ème mois d'expérimentation prouve l'action pernicieuse de l'aflatoxine sur le développement pondéral des animaux.

Poids moyen d'un rat soumis à l'aflatoxine pendant 11 mois (en grammes)	Poids moyen d'un rat témoin de même âge (en grammes)
185	240

La différence de poids entre la série qui ingère le régime toxique et celle qui ingère le régime non contaminé est hautement significative au seuil de 0,001 (calculé selon la loi de Student-Fisher T = 3,421).

A titre indicatif le tableau suivant rend compte des écarts entre les poids des sujets du lot témoin et ceux du lot expérimental, le choix de tous les animaux ayant été déterminé par tirage au sort dans chacune de ces deux séries.

Rats témoins 26 animaux âge : 12 mois	Différence de poids (en grammes) entre les 2 lots	- Rats intoxiqués de même âge : 26 animaux - Ingestion d'aflatoxine pendant 11 mois
Poids en grammes		Poids en grammes
165	- 53	112
179	- 61	118
196	- 74	122
198	- 69	129
201	- 59	142
208	- 65	143
209	- 66	143
209	- 62	147
220	- 67	153
225	- 62	163
240	- 72	168
242	- 61	181
243	- 62	181
249	- 66	183
249	- 63	186
251	- 61	190
257	- 57	200
258	- 38	220
263	- 33	230
264	- 16	248
268	- 18	250
269	- 16	253
275	- 15	260
284	- 21	263
285	- 12	273
287	+ 6	293

Un troisième tableau est encore plus représentatif de la chute pondérale des animaux intoxiqués.

Nous avons choisi délibérément les 20 rats les plus maigres dans deux séries appariées -l'une soumise au toxique, l'autre série témoin- de 40 animaux chacune.

Nous calculons le gain de poids en 10 mois (du 2ème mois au 12ème mois d'élevage) pour chaque animal.

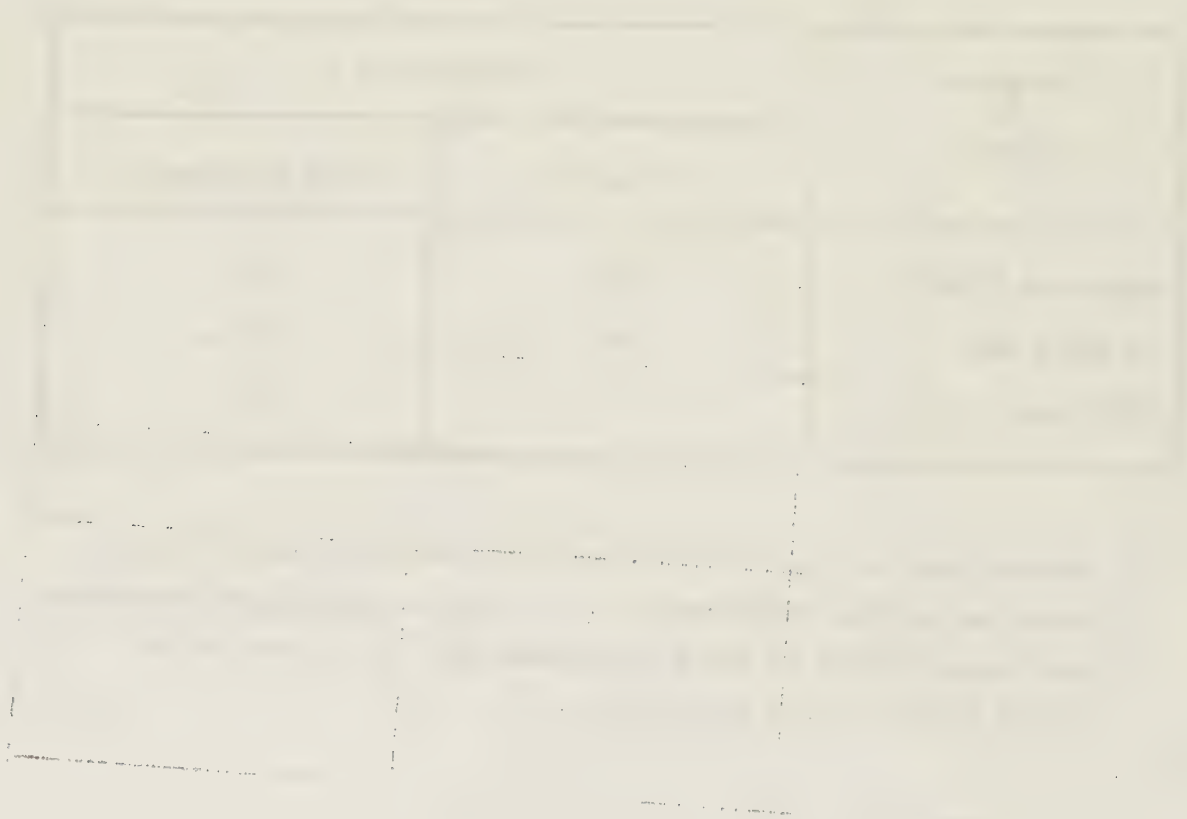
Poids (en grammes) des rats témoins âgés de		Poids (en grammes) des rats intoxiqués âgés de		Gain pondéral (en grammes) après 10 mois et demi	
2 mois	12 mois	2 mois	12 mois	Témoins	rats intoxiqués
42	179	45	114	137	69
42	215	46	118	173	72
45	165	47	143	120	96
45	243	51	145	198	94
46	209	51	147	163	96
58	209	52	141	151	89
60	220	54	126	160	72
62	251	55	152	189	97
65	196	60	130	131	70
67	201	60	160	134	100
68	198	62	165	130	103
70	208	69	220	138	151
70	242	70	168	172	98
70	257	75	182	187	117
71	235	77	186	164	109
71	249	77	196	178	129
72	231	78	183	159	105
72	240	78	178	168	100
75	225	82	206	150	124
85	249	85	181	164	96

Ici encore, le gain de poids des animaux témoins est nettement supérieur à celui des animaux intoxiqués au cours d'une expérimentation de 10 mois.

Un quatrième tableau permet de mieux se représenter l'importance des amaigrissements constatés; les échantillons comparés comportent 54 rats témoins et 54 rats consommant "ad libitum" le régime contaminé par les aflatoxines.

Catégorie de poids (g)	Pourcentages (1)	
	Témoins	Rats intoxiqués
supérieur à 240	63	25
de 185 à 240	29	23
inférieur à 185	8	52

(1) Pourcentages de répartition des rats en fonction du poids atteint après une période expérimentale de 11 mois. Le poids moyen des sujets est respectivement de 240 à 185 grammes pour les animaux du lot témoin et ceux du lot expérimental.



On remarque qu'après 11 mois le nombre des sujets dont le poids est inférieur à 240 g est respectivement de 37 et 75 % dans le lot témoin et le lot de rats intoxiqués. Cependant 25 % des rats intoxiqués ont réussi la performance de dépasser ce poids.

L'analyse statistique des résultats met donc en évidence :

- l'action pernicieuse des aflatoxines sur le développement pondéral des rats en expérimentation.
- la susceptibilité particulière, à l'intérieur des séries expérimentales, de certains animaux cachectiques, apathiques, apeurés, léthargiques.

II - BILANS AZOTES

L'amaigrissement peut-il s'expliquer par une insuffisance de la prise alimentaire résultant de l'inappétence des animaux intoxiqués ? L'étude des bilans azotés renseigne sur ce point.

- le CBRA et le CUD sont calculés au cours de chaque expérimentation

$$\text{CBRA (1)} = \frac{\text{Azote ingéré} - (\text{azote fécal} + \text{azote urinaire}) \times 100}{\text{Azote ingéré} - \text{azote fécal}}$$

$$\text{CUD (2)} = \frac{\text{Azote ingéré} - \text{azote fécal} \times 100}{\text{Azote ingéré}}$$

CBRA (1) : Coefficient brut de rétention azotée d'après E. Terroine

CUD (2) : Coefficient apparent d'utilisation digestive (sans tenir compte de l'azote fécal endogène)

- La récolte des fèces et des urines s'effectue séparément tout au long de l'expérience ainsi que le dosage de l'excrétion azotée correspondante.

Protocole expérimental :

- L'expérimentation est conduite sur deux lots de 15 rats âgés de 8 mois. Les animaux sont placés dans des cages à métabolisme et soumis aux mêmes conditions expérimentales. La période de préadaptation au régime imposé est de 8 jours.

- Le régime témoin et le régime toxique renferment 2716 mg d'azote pour 100 g d'aliment, soit 17 % de protéine brute.

- Au cours de la période expérimentale fixée à 57 heures la consommation alimentaire ramenée à 24 heures est nettement plus faible chez les rats intoxiqués (243 contre 290 g/jour).

Protocole	Teneur en mg d'azote de 100 g - de régime	Consommation alimentaire des rats (g)	durée de l'expérimentation (heures)	CBRA	CUD
15 rats témoins	2 716	290	57	98	67
15 rats intoxiqués	2 716	24[illegible]	57	97	75

Le niveau plus faible de la prise alimentaire des sujets consommant les aflatoxines pourrait expliquer, au moins partiellement, les amaigrissements au cours d'une période expérimentale prolongée (page 116).

Une moins bonne utilisation digestive du régime toxique ne peut être retenue comme cause d'amaigrissement puisque le CUD des rats intoxiqués se trouve être du même ordre - et même légèrement supérieur pour l'ensemble des 15 cas observés - à celui des témoins.

- Quant au coefficient de rétention azotée il est pratiquement identique chez tous les sujets.
- L'étude des bilans azotés ne permet donc pas d'expliquer l'amaigrissement des rats expérimentaux au cours d'une intoxication à court terme. Jusqu'à présent celui-ci semble ne résulter que d'une prise alimentaire moins abondante.
- Pour des raisons matérielles, il n'a pas été possible d'effectuer des bilans azotés sur des animaux soumis à une longue intoxication chronique.

III - MODIFICATIONS SANGUINES

a) dans le sérum : c'est à ce niveau - entre autres - que nous avons recherché les répercussions d'éventuelles perturbations du métabolisme azoté chez les sujets soumis à une longue intoxication.

Un taux protéique sérique global, obtenu par réfractométrie, est déterminé pour chaque individu d'une population animale comprenant 60 rats normaux et 60 rats agressés, tous âgés de 12 mois.

La différence intergroupes des taux protéiques est significative au seuil de 0,01 (calculé selon la loi de Student-Fisher $t = 2,582$).

Le métabolisme protéique des rats qui ingérent les aflatoxines pendant 10 mois est donc perturbé.

Cependant, pour l'interprétation des résultats, il ne semble pas que l'on puisse systématiquement établir une relation de cause à effet entre l'amaigrissement et la chute du taux de la fraction protéique du sérum car :

1°) - Au troisième mois d'intoxication la différence des taux protéiques sériques entre 2 séries de rongeurs - 20 rats aflatoxines appariés à 20 rats témoins - n'est même pas significative à 1 % ($t = 1,118$ pour un nombre de degrés de liberté égal à 19).

2°) - Il est fréquent de constater que le mauvais état général d'un animal agressé et son amaigrissement au cours du développement d'un cancer hépatique ne s'accompagnent pas obligatoirement d'une chute des protéines sériques totales.

D'autant que :

- l'augmentation préférentielle de certaines fractions protéiques au cours de l'organisation des tumeurs hépatiques, et l'apparition relativement massive de globulines spécifiques dans les infections intercurrentes associées au mauvais état général, peuvent arriver à compenser un abaissement du niveau protéique global.

. L'étude des protidogrammes électrophorétiques renseigne encore mieux sur les perturbations du métabolisme azoté.

- Au cours des intoxications, le taux d'albumine sérique des animaux anorexiques et dénutris est infranormal.
- La fraction albumine des rats témoins (50 animaux) représente 31,50 % des constituants protéiques. Elle correspond à 29,50 % de l'ensemble des protéines du sérum des rongeurs intoxiqués (50 animaux).
- La différence intergroupe du pourcentage en fraction gammaglobuline totale ne paraît pas significative.

b) Au niveau des érythrocytes :

- Les numérations globulaires, leucocytaires, thrombocytaires des animaux agressés et les valeurs de leurs hématocrites, sont paranormales. Signalons encore que les volumes et les résistances globulaires sont comparables pour les deux groupes de rongeurs confrontés.
- La qualité et la nature de l'hémoglobine ne semblent pas modifiées par le toxique comme le suggèrent les électrophorèses du pigment sanguin pratiquées par la méthode de Cabannes et Coll (38).
- Cependant, du point de vue quantitatif, le taux moyen d'hémoglobine des rats intoxiqués n'est jamais équivalent à celui des rats témoins (lot aflatoxine = 14,30 g d'Hb/l, lot témoin = 16,75 g/l).

IV - EXCRETION DE LA CREATINE ET DE L'UREE

. Ainsi le métabolisme azoté parait profondément perturbé. Deux méthodes analytiques complémentaires en rendent compte :

1°) - Le dosage de la créatinine urinaire : un taux considérable dans les urines correspond à un catabolisme intense, une usure tissulaire anormale, une fonte musculaire importante.
La créatinine urinaire, très élevée, peut excéder 240 mg/litre au cours de l'excrétion de l'animal consommant le toxique. Elle se maintient à la moyenne de 180 mg/litre d'urine chez le rat normal.

2°) - La détermination des concentrations d'urée dans les urines émises confirme le catabolisme azoté intense des rongeurs agressés.
- En effet, ces concentrations (recherchées par dosage à l'hypobromite) sont en moyenne deux fois plus élevées dans l'urine des rats intoxiqués.
- Le filtre rénal, qui conserve son intégrité histologique joue certainement un rôle mineur dans l'apparition ou la pérennité de telles différences.

V - LESIONS DU TRACTUS DIGESTIF

- L'amaigrissement peut-il s'expliquer par un dysfonctionnement chronique au niveau du tube digestif et de ses annexes

Nous avons pu décrire, à l'autopsie de certains rats qui ingèrent depuis 12 mois de l'aflatoxine, des lésions de gastrite et de

duodénite, des érosions de la muqueuse colique (123).

De telles lésions qui apparaissent couramment au cours de l'intoxication chronique résultant de l'ingestion de divers toxiques ne présentent ici aucun caractère de spécificité.

Butler et Coll observent de rares cancers gastriques en zone glandulaire chez des rats qui consomment l'aflatoxine (36).

Les lésions hépatiques sont fréquentes. Rappelons qu'il s'agit de fibrose, de nodules d'adénomatose et de régénération, d'angiomatose kystique, de foyers de prolifération biliaire, d'infiltrats inflammatoires, de lésions dégénératives et nécrotiques associées aux carcinomes hépato et cholangio-cellulaires (123).

On conçoit aisément que l'ensemble de ces lésions reconnues chez au moins 75 % des animaux intoxiqués chronique puissent perturber la digestion et l'absorption alimentaire; la transformation des aliments complexes en nutriments dès lors se fait mal.

VI - ROLE EVENTUEL DES GLANDES ENDOCRINES

La glande thyroïde, le pancréas des rats intoxiqués ne présentent pas de lésions histologiques caractéristiques. Nous ne pouvons cependant pour autant certifier l'intégrité qualitative et quantitative de leurs sécrétions hormonales.

- Nous signalons dans un travail récent (124) les perturbations considérables du métabolisme des androgènes au cours de l'intoxication.

- Sont-elles provoquées par les dysfonctionnements de la cellule endocrine testiculaire, ou par les dérèglements de la glande surrénale, ou par les alterations de la cellule hépatique, ou encore par une altération antéhypophysaire? Nous n'avons pu jusqu'à présent qu'apporter une réponse incomplète à certaines de ces questions.
Cependant, toutes ces lésions cytologiques, ces sécrétions anarchiques, ces perturbations métaboliques, paraissent des causes partielles du mauvais état général permanent remarqué au cours des amaigrissements.

De fréquentes lésions parenchymateuses : pneumonies, bronchopneumonies, abcès rénaux (5 % des animaux) majorent encore l'importance des altérations staturo-pondérales. La cachexie prémortelle des animaux n'est pas rare (125).

VII - COMPORTEMENT IMMUNOLOGIQUE

Nous suggérons que l'une des causes primordiales des amaigrissements pourrait être le dysfonctionnement ou l'inhibition de la biosynthèse protéique.

Dysfonctionnement et inhibition sont d'ailleurs prouvés par des observations immunologiques.

A - L'aflatoxine provoque l'exclusion d'une séquence antigénique protéique (120)

- Cette exclusion est décelée au cours de la transformation maligne de la cellule hépatique du rat.

- Nous avons pu la mettre en évidence par l'étude des diagrammes immunoélectrophorétiques des sérums de rats qui consomment depuis

14 mois un régime contaminé par les flavotoxines - (régime commercial contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines impures).

- Un lot de rats consommant un régime de base identique, mais non contaminé, sert de témoin.

- Les prélèvements et les modalités d'obtention des sérums d'une part, l'immunisation des lapins par des pools de sérums de rats normaux d'autre part, ont été précisés au chapitre III.

- Notons que l'épuisement des immunsérums antisérums de rats normaux par les sérums de rats intoxiqués s'effectue dans un bain marie à 37°C pendant 3 heures, suivi d'un séjour à + 4°C pendant 8 heures. Après centrifugation de l'épuisement à 5.000 t/m le surnageant est contrôlé par double diffusion selon Outcherlony (136) et par analyse immunoélectrophorétique selon Grabar et Williams (75).

Les techniques de caractérisation des constituants antigéniques sont celles préconisées par Uriel (186).

Mise en évidence du constituant antigénique disparu :

L'épuisement de l'immunsérum antisérum de rat normal (ASSRN) par un mélange de sérums de rats recevant quotidiennement de l'aflatoxine pendant 14 mois (SRAF) nécessite une proportion de 1 ml d'ASSRN pour 0,08 ml de SRAF. Cet immunsérum épuisé ne réagit plus avec un SRAF; par contre une réponse nette, faite d'une ligne de précipitation, résulte de sa confrontation avec un SRN. Ainsi le diagramme immuno-électrophorétique sérique du rat ingérant le toxique a perdu une

ligne de précipitation.

Identification du constituant antigénique disparu :

Dans le diagramme immunoélectrophorétique du sérum de rat normal cette ligne de précipitation se situe dans la zone des α_1 globulines. Sa mobilité rapide est nettement inférieure à celle de l'albumine sérique du rat.

Cet antigène ne prend ni la coloration des liproprotéines au Soudan noir, ni la coloration des glycoprotéines par la réaction acide périodique-formazan. Cette ligne de précipitation ne supporte aucune des activités enzymatiques suivantes : activité estérase et cholinestérase, malico-deshydrogénase, glutamo-deshydrogénase et lactate deshydrogénase. Ce n'est ni une céruloplasmine ni une autre métalloprotéine.

L'exclusion de cette séquence antigénique sérique est manifeste pour tous les animaux d'une série de 12 rats ingérant le toxique pendant 14 mois.

Cette disparition de fraction protéique correspond vraisemblablement à l'image de mutation par défaut, provoqué par les aflatoxines, dont nous aurons l'occasion de reparler (cf. page 159).

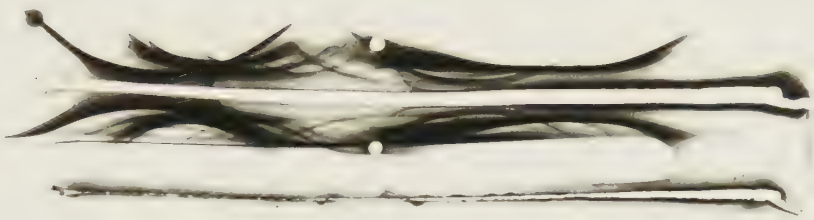


Image immunoélectrophorétique de l'α1 - globuline disparue du sérum de rat recevant pendant 14 mois le régime contaminé.

- Cuve supérieure : SRAF (sérum de rat soumis à l'aflatoxine)
- Réservoir supérieur : ASSRN (antisérum de rat normal)
- Cuve intermédiaire : SRN (sérum de rat normal)
- Réservoir inférieur : ASSRN épuisé par SRAF (antisérum de rat normal épuisé par sérum de rat soumis à l'aflatoxine)
- Cuve inférieure : SRAF (sérum de rat soumis à l'aflatoxine)

B - Synthèse d'une protéine nouvelle :

- Les aflatoxines provoquant la disparition de synthèses protéiques, il paraît donc improbable que le sérum des rats intoxiqués ou cancéreux, renferment les néoantigènes caractéristiques des processus de cancérisation expérimentale.

- Il reste cependant l'élégance suggestion de Roth (153) : le brin réplique d'un ADN peut occasionnellement se scinder, puis se joindre à

son brin modèle, l'ensemble contrôlant la synthèse d'une espèce protéique nouvelle, pour expliquer la formation de "néoantigènes".

- Sans préjuger du processus de formation de ces protéines, nous avons essayé de déterminer l'éventuelle importance de l'aflatoxine dans leur apparition.

- 30 rats mâles Wistar Commentry sont utilisés pour l'expérimentation. Ils consomment dès le sevrage un régime commercial mélangé à un tourteau d'arachide artificiellement contaminé par Aspergillus flavus (voir page 37).
- 0,75 mg d'aflatoxines sont ainsi ajoutés par kilogramme d'aliment.
- Les modes de prélèvements du sérum des rongeurs ont été précisés au chapître III.

  Rappelons cependant qu'il peut s'agir ici de sérum obtenu à partir d'un seul animal ou d'un mélange de sérums résultant de la ponction de tous les animaux étudiés.

- La préparation des immunsérums nécessaires aux réactions immunologiques est déjà connue. Elle a été décrite page 39 et 40.

- L'immunisation des lapins est poursuivie jusqu'à ce que le nombre d'arcs de précipitation,obtenus en immunoélectrophorèse par la confrontation de l'antigène et de l'immunsérum anticorps, n'augmente plus.

- L'immunsérum recueilli (A.S.R.A.F.), de par sa richesse en anticorps, caractérise aussi intensément les globulines que les albumines sériques.

- L'épuisement des antisérums par les sérums adéquats et la concentration des fractions protéiques nouvelles par dialyse contre la polyvinyl-pyrrolidone à 40 % en eau distillée, s'effectuent selon les méthodes classiques.

- Enfin, l'étude des diverses fractions protéiques du sérum de rat se pratique, ainsi qu'il est exposé page 41 , par double diffusion en milieu gélosé et par immunoélectrophorèse. Les protéines, glycoprotéines, et lipoprotéines sont caractérisées par les colorants usuels.

Résultats :

L'épuisement de l'immunsérum de lapin antisérum de rat aflatoxine (A.S.R.A.F.) par un mélange de sérums de rats normaux se fait dans une proportion de 1 ml d'A.S.S.R.A.F. pour 0,04 ml de S.R.N.

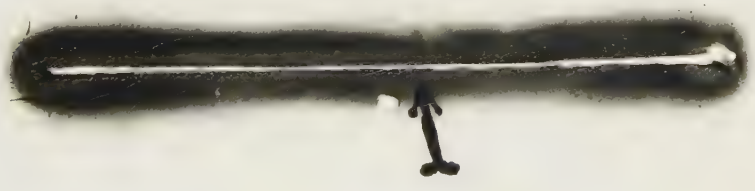
Cet immunsérum épuisé ne réagit plus avec un S.R.N. mais il peut révéler l'existence d'un antigène nouveau dans le sérum du rat intoxiqué par les aflatoxines.

Il s'agit alors d'une protéine de mobilité immunoélectrophorétique β - arc de précipitation curviligne, net, étendu, assez proche de la gouttière des anticorps mais logeant dans sa convexité le réservoir antigène - qui n'accepte pas la coloration des glycoprotéines.

Une protéine analogue est reconnue par Dufour et Coll (67) associée à la croissance, à la régénération hépatique et au développement tumoral.

Cette fraction devrait donc être fréquemment rencontrée ! Pourtant elle n'a été retrouvée qu'une seule fois dans un lot de 30 rats intoxiqués par les aflatoxines ou porteurs d'hépatocarcinomes.

Il s'agissait d'un rat cancéreux (carcinome hépatocellulaire) soumis au régime toxique depuis 20 mois.



La protéine exceptionnelle du sérum du rat intoxiqué par l'aflatoxine

Cuve supérieure : SRN (sérum de rat normal)
Cuve inférieure : SRAF (sérum de rat soumis à l'aflatoxine depuis 10 mois).
Réservoir central : épuisement de l'ASRAF par le SRN.

Ainsi au cours de l'intoxication la biosynthèse protéique est considérablement modifiée et ceci se traduit par la disparition habituelle d'une fraction protéique et très exceptionnellement par l'apparition d'une nouvelle fraction.

Reste à savoir si dans le premier cas l'ingestion quotidienne d'aflatoxine est indispensable pour créer l'inhibition partielle d'une biosynthèse ou si une unique dose toxique administrée dès le sevrage suffit à la provoquer.

En d'autres termes l'exclusion d'une fraction protéique dépend-t-elle de la surcharge chronique ou est-elle consécutive au processus néoplasique induit puis auto-entretenu?

Ces questions demeurent encore sans réponse. Pour Clifford et Coll (52) de telles modifications de synthèse à l'intérieur d'une espèce témoignent de l'affinité particulière du toxique pour certains A.D.N.

Quoiqu'il en soit, une éventuelle réaction permettant le diagnostic du cancer du rat provoqué par les aflatoxines pourrait-être caractérisée essentiellement par l'exclusion d'une séquence protéique et non par l'apparition de "néoantigènes.

Ceci corrobore les suggestions de Mathé et Coll (114) pour qui les néoantigènes des cellules tumorales,indépendants de la cancérisation, ne sont que le reflet d'un effet particulier de l'action du cancérigène.

C - A l'encontre de certains agents agressifs, les aflatoxines ne peuvent réaliser la facile dérépression des antigènes embryonnaires chez le rat adulte (122, 125)

On sait que les constituants antigéniques sériques spécifiques de l'embryon du rat sont (165) :

. L'antigène L.A. : c'est une globuline rencontrée dans le liquide amniotique (L.A.), le sérum embryonnaire, et le sérum de la femelle gestante. Sa mobilité immunoélectrophorétique est rapide, analogue à celle de l'albumine sérique du rat.

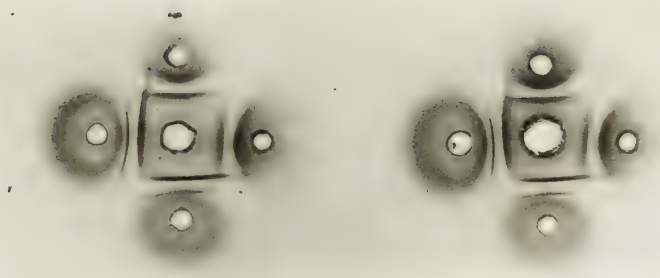
. L'α_2 glycoprotéine : elle est présente dans le sérum embryonnaire et dans celui de la femelle gestante. De mobilité intermédiaire elle migre comme une α_2 globuline.

. La lipoprotéine estérase : on la rencontre dans le sérum de rat adulte mais sa concentration dans le sérum embryonnaire est quatre fois supérieure. Elle est caractérisée par sa faible diffusion en gel d'agarose et par ses propriétés soudanophiles.

•Isolement des fractions embryonnaires

. L'immunsérum antisérum embryonnaire de rat, obtenu à partir du lapin et épuisé par un pool de sérums de rats adultes, contient 2 fractions anticorps spécifiques - la fraction anti L.A. et la fraction anti α_2 glycoprotéine - qui ne réagissent pas avec le sérum de rat normal.

. Cet immunsérum révèle également l'existence d'une lipoprotéine décrite dans le sérum de rat normal mais sa concentration est quatre fois supérieure dans le sérum embryonnaire de rat.



Les 3 antigènes embryonnaires étudiés par la méthode d'Outcherlony.

Réservoir de gauche - réservoir inférieur : sérum embryonnaire de rat; réservoir central = immunsérum antisérum embryonnaire de rat.

La fraction L.A. peut être isolée du liquide amniotique et purifiée par la méthode d'Avraméas et Thernynk (20).

Injectée au lapin elle peut servir à préparer, selon la technique de Stanislawski - Birencwajg (165), des immunsérums anti L.A.

Pour obtenir des immunsérums anti α_2 glycoprotéine spécifique il faut utiliser des méthodes d'épuisement répété.

Des lots de sérums de rats témoins :"antigène L.A. négatif" et "α_2 glycoprotéine embryonnaire négative", des sérums de rats adultes dépourvus de fractions embryonnaires, servent de témoins pour l'étude de chaque série expérimentale.

Toutes les recherches concernant les protéines embryonnaires se pratiquent après recueil du sérum par ponction des sinus ophtalmiques des rongeurs (Halpern et Pacaud (78))

Les sérums sont analysés par les méthodes immunoélectrophorétiques classiques (75, 136).

Caractères de l'α_2 glycoprotéine embryonnaire :

L'α_2 glycoprotéine est caractérisée par sa vitesse de migration; elle est colorée par la réaction acide périodique-formazan. Elle se différencie aisément de la lipoprotéine qui prend très fortement la coloration noir soudan.

Dans les conditions expérimentales recommandées elle présente une activité hydrolytique vis-à-vis de l'acétate de β naphtyte (186).

Pour faire apparaître l'α_2 glycoprotéine embryonnaire sérique dans le sérum du rat blanc adulte, il suffit d'injecter à l'animal une solution de $CdSO_4$ (injection intrapéritonéale de 1mg/kg de poids) ou de CCl_4 (une injection I.P. de 0,1 ml par animal).

Ces échantillons de sérums riches en α_2 glycoprotéine sérique sont conservés et servent de témoins de référence au cours de nos diverses expérimentations.

1. Caractères physico-chimiques de l'α_2 glycoprotéine :

Ces sérums sont soumis à la dénaturation par vieillissement (conservation et étude après 20 jours à la température du laboratoire) ou par la chaleur (de - 30°C à + 100°C) en milieu acide (pH = 2) ou alcalin (pH = 10).

Dans tous les cas d'éventuelles proliférations bactériennes sont évitées par addition d'azide de sodium (solution au $\frac{1}{100}$ème)

L'α_2 glycoprotéine est résistante aux processus de dénaturation et aux agressions physico-chimiques les plus diverses.

Résistante à la dénaturation par le vieillissement, la chaleur et les modifications de pH, elle reste identifiable par un immunsérum antisérum embryonnaire de rat épuisé ou non, et par un immunsérum monospécifique anti α_2 glycoprotéine.

L'antigène embryonnaire subit néanmoins la dénaturation par la chaleur, mais il faut atteindre des températures très élevées (90°C) pour qu'elle soit complète.

. La dénaturation alcaline et acide ne modifie pas sensiblement la mobilité électrophorétique en gélose de l'α_2 glycoprotéine, ni sa mobilité immunoélectrophorétique.

2. Spécificité zoologique de l'α_2 glycoprotéine :

Les animaux étudiés sont :

a) des rongeurs d'élevages sélectionnés :

. 150 rats blancs souche Wistar, WAG, CF

. 20 souris blanches Swiss albino

b) des rongeurs d'élevages issus de multiples croisements :

. 30 rats blancs de lignée impure

c) des rongeurs sauvages :

. rats palmistes (Xerus erythropus)

. gerbilles du genre Tatera

. musaraignes (Crocidura sp.)

. arvicanthis sp.

. Cricetomys gambianus Waterhouse (rat de Gambie)

d) d'autres rongeurs : lapins de race commune.

- L'α_2 glycoprotéine n'est pas l'antigène caractéristique d'une famille, d'une tribu, d'un genre ou d'un sous-genre de rongeurs. Cette protéine - apparue au cours de l'agression toxique - est spécifique du rat blanc, comme le suggère les résultats suivants :

a) Les rongeurs d'élevage :

Après injection parentérale de Cd S O4, le sérum de tous les rats Wistar WAG, CF renferme de l'α_2 glycoprotéine. Il en est de même pour les rats blancs résultant de croisements quelconques.

Chez la souris Swiss albino, et dans les mêmes conditions expérimentales l'α_2 glycoprotéine n'apparaît que dans le sérum de 10 à 20 % des sujets intoxiqués.

b) Les rongeurs sauvages :

Ils ne présentent qu'exceptionnellement l'α_2 glycoprotéine sérique après inoculation toxique de Cd SO4.

Des traces ont pu être décelées dans le sang de Cricetomys Gambianus Waterhouse (3 % des animaux testés).

Le sérum des autres rongeurs sauvages de la liste précédente ne semble pas en comporter.

Il faut préciser cependant qu'il ne s'agit que d'échantillonnages restreints portant seulement sur 10 individus pour chaque espèce testée. En ces conditions toute interprétation statistique serait donc sujette à caution.

En outre, en utilisant un immunsérum antisérum embryonnaire de rat, on peut retrouver dans le sang de certains rongeurs sauvages et notamment Arvicanthis sp et gerbilles, la lipoproteine commune aux rats blancs.

Quant au lapin ni l'α_2 glycoprotéine, ni la lipoprotéine ne peuvent être décelées dans son sérum.

Ainsi l'α_2 glycoprotéine embryonnaire sérique est une protéine résistant à la dénaturation, dont la répartition est étroitement liée à l'espèce zoologique - et même à la race - des sujets intoxiqués par CdSO4.

Genèse et disparition des protéines embryonnaires :

a) chez le rat normal :

Selon Stanislawski-Birencwajg (166) l'antigène LA embryonnaire du rat nouveau-né disparaît au cours des 3 semaines qui suivent la naissance. La disparition de l'α_2 glycoprotéine est un peu plus tardive.

Dans le sérum de la femelle gestante on note la présence de l'antigène L.A. et de l'α_2 glycoprotéine embryonnaire. Après la mise-bas ces fractions cessent rapidement d'y être décelables.

b) chez le rat intoxiqué :

Nous utilisons des séries de rats qui consomment un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines :

1) 30 rattes gestantes

2) 30 femelles dès la mise-bas
3) 30 rattes allaitantes (ici il convient d'insister sur le fait que l'aflatoxine ingérée passe dans le lait)
4) 30 ratons à la période de sevrage
5) 15 rats porteurs d'hépatocarcinomes "α_2 glycoprotéine +
6) 20 rats intoxiqués par CdSO4 et dont le sérum contient l'α_2 glycoprotéine embryonnaire
7) 25 rats - porteurs d'hépatocarcinomes provoqués par l'aflatoxine - mais dont le sérum est exempt d'α_2 glycoprotéine -

Tous ces animaux reçoivent une injection de CdSO4 afin de contrôler ultérieurement si l'α_2 glycoprotéine, dont l'apparition est consécutive à l'intoxication cadmique, demeurera ou non dans le sérum d'un animal traité par les aflatoxines.

Résultats :

On remarque que la distribution quotidienne d'aflatoxines aux 7 séries de rats ne provoque pas de perturbations essentielles dans la génèse et la disparition de l'α_2 glycoprotéine.

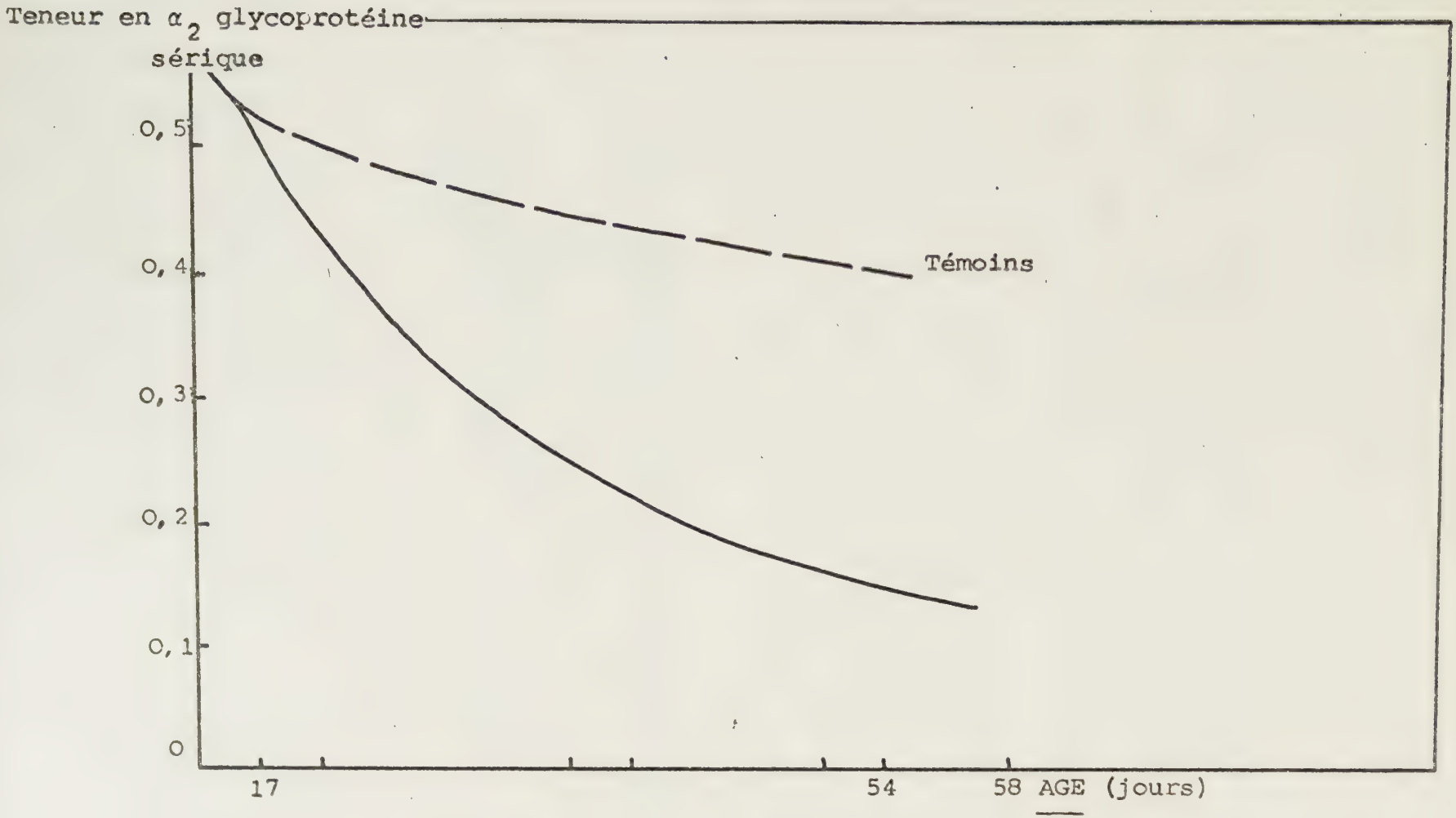
a) c'est ainsi que le sérum de la ratte gestante intoxiquée, et celui de la ratte gestante normale, comportent la fraction protéique 10 jours environ avant et après la parturition.

b) Des lots de rats nouveaux-nés nourris par des mères intoxiquées reçoivent dès le sevrage un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines

- L'étude des courbes de disparition de l'α_2 glycoprotéine dans le sérum de ces ratons, rapportées à celles des ratons témoins qui ingérent un régime atoxique, sont pratiquement identiques.

Pour les déterminer un même opérateur utilise une échelle de valeurs conventionnelles et approximatives qui définit la concentration de l'α_2 glycoprotéine sérique en fonction de la longueur et de la densité de sa ligne de précipitation sur gélose (double diffusion).

Les modalités techniques sont analogues pour tous les sérums que l'on est amené à comparer. (cf Graphique page 139 bis)



Variations comparées de la teneur en α_2 glycoprotéine sérique en fonction de l'age des sujets. A partir du 17^{e} jour l'ensemble des rats est divisé en deux lots équivalents de 50 sujets. Le lot expérimental reçoit le régime contaminé standard à 0,75 p.p.m. d'aflatoxine.

. Nous avons pu mettre en évidence cette fraction protéique :
  - dans le sérum des ratons intoxiqués 58 jours après la délivrance
  - dans le sérum des ratons témoins jusqu'au 54ème jour (et pour 1/5 des animaux jusqu'au 62ème).
. Les irrégularités du tracé de la courbe de décroissance restent à expliquer.

c) Enfin d'une part si des doses quotidiennes d'aflatoxines ne provoquent pas la disparition de l'α_2 glycoprotéine embryonnaire chez les rats porteurs d'hépato-carcinomes "α_2 glycoprotéine (+) ", et chez les sujets agressés par CdSO4, d'autre part ces mêmes doses quotidiennes ingérées par des rats cancéreux "α_2 glycoprotéine (-) " n'empêchent pas l'apparition de l'antigène embryonnaire au cours de l'intoxication seconde par CdSO4 ou CCl4.

Modes d'apparition des protéines embryonnaires chez les rongeurs infestés ou traités par certains agents pharmacodynamiques (122)

Une subdivision schématique est donnée qui permet d'évaluer la facilité plus ou moins grande de différents agents agressifs, à faire apparaître l'α_2 glycoprotéine embryonnaire normalement absente du sérum de rat adulte.

I - AGRESSIONS BACTERIENNES

Microorganismes en cause	α_2 Glycoprotéine du sérum (en pourcentage)
Salmonella typhi	100 %
Salmonella enteritidis	100 %
Salmonella typhi murium	100 %
Staphylocoque doré	100 %
Shigella dysenteriae	100 %
Enterocoque	100 %

- Les microorganismes bactériens sont recueillis à partir de cultures entretenues sur gélose.
- La quantité de microbes, injectés par voie intrapéritonéale à l'animal, n'est pas exactement dénombrée.

  Au cours de cette expérience la survie des animaux n'excède jamais une semaine.

  L'α_2 glycoprotéine embryonnaire est présente dans leur sérum dès la 24ème heure après l'inoculation pathogène.

II - AGRESSIONS VIRALES

. Le rat adulte reçoit une unique injection intrapéritonéale de vaccin antirabique humain phénique et lyophilisé (type Fermi) - $\frac{1}{8}$ de la dose quotidienne nécessaire à la conduite du traitement antirabique chez l'homme.

- C'est un vaccin à virus atténué.
- 80 % d'une population de rats adultes recevant le vaccin présente dans son sérum et dès la 24ème heure , l'α_2 glycoprotéine embryonnaire.

. L'inoculation sous-cutanée du vaccin antiamaril lyophilisé (souche vivante 17 D) à des doses 8 fois inférieures à celles préconisées pour l'homme, provoque l'apparition en 24 heures de l'α_2 glycoprotéine chez 100 % des animaux en expérimentation.

III - AGRESSIONS PARASITAIRES

Nous utilisons une souche de Trypanosoma gambiense, dénommée souche "Lobez", dont nous avons atténué la virulence, par passage sur souris, et qui provoque une maladie évoluant lentement chez le rat Wistar.

. La rapidité d'apparition de l'α_2 glycoprotéine est variable; elle dépend de la concentration parasitaire de l'inoculum infestant.

Quarante huit heures après l'injection intrapéritonéale de 100 trypanosomes, on peut évaluer statistiquement à 80 % le nombre des animaux chez lesquels peut se déceler la présence d'α_2 glycoprotéine embryonnaire.

IV - AGRESSIONS TOXIQUES

L'α_2 glycoprotéine avons-nous vu, est présente dans le sérum de tous les rats traités par CdSO4 ou CCl4 dès la 24ème heure suivant l'inoculation toxique.

. Lorsque des arthrites formolées sont provoquées par injection de 1 ml de formaldéhyde à 1% dans l'aponévrose plantaire du membre postérieur gauche du rat, les résultats sont analogues - L'α_2 glycoprotéine embryonnaire est retrouvée chez 100 % des animaux 24 heures après l'agression.

V - INJECTIONS MEDICAMENTEUSES

1 ml d'une solution comprenant 0,20g de sulfate de streptomycine/ml d'eau bidistillée est injectée à chaque animal par voie intramusculaire.

. Dès la première injection et dès la 24ème heure, 90% des rats présentent l'α_2 glycoprotéine embryonnaire dans leur sérum.

VI - INTERVENTIONS TRAUMATISANTES

. 24 heures après hépatectomie partielle comprenant l'ablation du $\frac{1}{3}$ du foie, l'α_2 glycoprotéine est décelée dans le plasma de 100% des rongeurs qui ont subi l'intervention chirurgicale.

. Ces derniers résultats confirment et complètent ceux de Stanislawski-Birencwajg (166).

. Les résultats de toutes ces expériences nous permettent de penser que l'α_2 glycoprotéine embryonnaire est une protéine "d'alarme"; elle est absente du sérum de rat normal mais chez les animaux agressés elle apparaît avec une constance surprenante.

Il semble donc qu'une circonstance favorisante - en l'occurrence le processus agressif - provoque la derépression aisée, c'est-à-dire la remise en activité, d'une "voie de synthèse" d'antigène embryonnaire normalement reprimée mais non détruite.

Rôle éventuel des hormones (125)

Les expériences suivantes laissent supposer qu'elles jouent un rôle dans l'apparition de l'α_2 glycoprotéine sérique.

Deux lots de rats Wistar sont sélectionnés pour les études du métabolisme de la protéine embryonnaire.

Le premier est divisé en 7 séries de 20 rats chacune recevant une hormone différente par voie parentérale.

- Adrénaline par voie sous cutanée (1 mg pour 5 rats).
- Noradrénaline par voie intrapéritonéale (2 mg de l. noradrénaline base pour 10 rats).
- Thyroxine (synthétique) par voie intramusculaire (0,25 mg/rat).
- Hormone somatotrope antéhypophysaire (lyophilisée), injection intramusculaire de 20 unités - rat/rat.

- Diéthylstilboestrol (oestrogène de synthèse) - même voie d'inoculation 2 mg 5/animal,
- Progestérone (caproate d'hydroxyprogestérone) en injection intramusculaire 30 mg/rat,
- A.C.T.H. (extraite du lobe antérieur de l'hypophyse) 10 U.I./rat par voie intramusculaire.

. Le second lot est divisé en 3 séries de 20 rats recevant respectivement de l'histamine et des vitamines :

- Bichlorhydrate d'histamine pur, $\frac{1}{200}$ ème de milligramme/rat par voie sous cutanée,
- Vitamine B_{12} : 250 microgrammes de cyanocobalamine anhydre par animal et par voie intramusculaire,
- Vitamine K1 (DL - 2 méthyl - 3 phytyl - 1,4 naphtoquinone) : 25 mg/rat en injection intramusculaire.

Dans chacune des séries de ces deux lots, certains sujets reçoivent en outre

- du Méthanesulfonate de dihydroergotamine capable de bloquer l'effet de la noradrénaline et de l'adrénaline = 0,5 mg/rat par voie intramusculaire,
- un antithyroidien de synthèse (1 - méthyl - 2 mercapto imidazole) donné par gavage : 0,008 g de principe actif par animal,
- un modérateur hypothalamo-hypophysaire de synthèse, la [illegible] 0,50 g per os/rat,
- enfin, un antihistaminique de synthèse (diméthylamino-2-propyl - 10 phénothiazine) : 10 mg par rat par voie intramusculaire.

Parmi les hormones injectées, seules les suivantes déterminent l'apparition de l'α_2 glycoprotéine dans le sérum du rat d'élevage.

Hormones	Délai de prélèvement du sérum après l'injection	Animaux α_2 glycoprotéine + (en pourcentage)
Adrénaline	15 minutes	25
	35 minutes	60
Noradrénaline	15 minutes	20
	35 minutes	68
Thyroxine	24 heures	5
	50 heures	0
H.S.T.	24 heures	60
	50 heures	0
Histamine	1 heure	0
	10 heures	40
	50 heures	0

Les résultats obtenus en utilisant l'A.C.T.H. ne nous ont pas parus démonstratifs -

- Ainsi les hormones les plus variées intervenant dans l'anabolisme protéique, la croissance, le tonus capillaire, la transmission de l'influx au niveau du

système nerveux ... font apparaître l'α_2 glycoprotéine dans le sang de certains rats.

- Les substances chimiques antagonistes de ces hormones ne semblent pas modifier le délai de survie de la protéine embryonnaire dans le sérum.
- Les vitamines utilisées ne provoquent pas l'apparition de la fraction protéique.

Toutes ces recherches ont pour but de souligner la dérépression aisée de l'α_2 glycoprotéine sous l'action de causes les plus diverses.

Signalons que l'antigène LA n'est jamais présent dans le sérum des rats quelle que soit l'agression en cause.

LES PROTEINES EMBRYONNAIRES APPARAISSENT EGALEMENT AU COURS DE LA CONSTITUTION DE CERTAINS HEPATOMES (166).

Il s'agit d'hépatocarcinomes induits par des agents chimiques : DAB, 3M'DAB * - Dans le sérum des rats porteurs on remarque la présence de 3 antigènes embryonnaires : l'antigène LA, l'α_2 glycoprotéine et la lipoprotéine estérase dont la concentration est ici supérieure à celle du sérum de rat normal.

Comparativement, nous avons étudié les sérums de rats porteurs d'hépatocarcinomes induits par les aflatoxines.

60 rats mâles et femelles ingérant pendant un an un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines constituent des hépatocarcinomes.

Leur sérum ne comporte jamais l'antigène LA, ni au cours de la période de cancérisation, ni au cours de l'organisation de la tumeur.

* DAB : diméthylaminoazobenzéne
3M'DAB : 3' méthyl 4 dimethylaminoazobenzène

De plus l'antigène ne peut-être décelé dans le tissu hépatique tumoral.

En ce qui concerne l'α_2 glycoprotéine nous avons déjà signalé la pérennité de sa présence 60 jours environ après la naissance, dans le sérum de jeunes rats soumis depuis le sevrage à un régime contaminé. Mais :

- l'α_2 glycoprotéine n'est retrouvée qu'une seule fois au cours de la cancérisation hépatique de 30 rats recevant l'aflatoxine pendant un an
- le sérum des rats porteurs d'hépatocarcinomes contient l'α_2 glycoprotéine dans 20 % des cas. Une étude statistique complémentaire, portant sur plus d'une centaine d'animaux, confirme ce résultat
- la concentration en lipoprotéine estérase sérique très élevée au cours des cancérisations par agents chimiques (DAB, 3M'DAB) est restée ici comparable - parfois inférieure - à celle d'un sérum de rat adulte normal.

Ainsi une circonstance favorisante comme le processus néoplasique pourrait provoquer, par un mécanisme de dérépression, la synthèse nouvelle d'un constituant embryonnaire spécifique - Comme on l'a précédemment constaté, sous l'effet de certaines intoxications la "voie de synthèse" des antigènes embryonnaires ne serait donc que réprimée.

Un schéma modèle de l'explication d'une dérépression est donné par Jacob et Monod (96) par Pitot et Cho (140) et par Pitot et Heidelberger (139).

En ce qui concerne l'aflatoxine elle présente donc une action singulière - Contrairement au DAB ou au 3 M'DAB elle n'est pas capable de déréprimer l'antigène LA mais elle demeure susceptible d'exercer particllement une telle activité vis-à-vis de l'α'_2 glycoprotéine embryonnaire.

Nous avons pu démontrer par ailleurs que l'aflatoxine n'entraîne pas la disparition des protéines embryonnaires présentes - Dans ce domaine elle n'aurait apparemment aucune action.

D - L'aflatoxine provoque également la disparition de fractions enzymatiques (121)

Jusqu'à présent la majorité des dosages enzymatiques ont été pratiqués sur sérum.

Il faut savoir pourtant, qu'en règle générale, les activités enzymatiques sériques sont bien moins importantes que celles des tissus.

C'est ainsi que les activités estérasiques sont très développées au niveau des lysosomes (88, 89, 159, 160), des microsomes (47, 49, 73, 84, 110,134) et du noyau de certains organes, dont le foie.

Pour des raisons de commodité, nous avons cependant décidé de choisir exclusivement des sérums de rats intoxiqués pour suivre les variations de la synthèse des estérases sous l'action des aflatoxines.

30 rats mâles Wistar Commentry reçoivent un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines pendant 18 mois - 85 % de ces animaux sont porteurs d'hépatocarcinomes.

30 individus témoins consomment le régime commercial standard non souillé.

Les animaux choisis sont sexuellement matures, le taux de certaines estérases étant très faible avant la maturité sexuelle (17).

Le sérum de chaque rat cancéreux est étudié extemporanément dans les mêmes conditions de température (+ 4° C) et de pH (8,7) que le sérum de rat normal.

Les modalités de prélèvement et de collecte des sérums ont déjà été précisées (cf page 38).

Une substance à grand pouvoir de résolution, l'agarose acrylamide, est utilisée comme support d'électrophorégramme. Cette substance conserve aussi bien que le gel d'agarose, habituellement choisi au cours des analyses immunoélectrophorétiques, l'intégrité des propriétés estérasiques des diverses fractions sériques.

L'enzyme hétérogène, va se fractionner en isozymes ou isoenzymes (9,112) caractérisées par l'hydrolyse d'un substrat déterminé.

Nous utilisons les substrats suivants, (ils proviennent toujours des mêmes firmes commerciales) :

- Acétate d'indoxyle (Koch - Light laboratories LTD)
- Acétate d'α naphtyle (Sigma chemical company)
- Acétate de β naphtyle - id -
- Laurate de β naphtyle - id -
- Iodure de carbonaphtoxycholine - id -
- Butyrate de β naphtyle (K and K laboratories Inc.)
- Iodure de 6-bromo-2 naphtyl carbonaphtoxycholine (K and K laboratories Inc)

La réaction estérase - substrat est visualisée par le sel de diazonium Diazo Blue B.

Les différentes fractions estérasiques caractérisées se disposent sous forme de bandes brun pourpre (substrat = acétate de β naphtyle) ou sous forme de bandes bleu ardoise (substrat = acétate d'indoxyle) plus ou moins épaisses, en des zones bien précises de la migration électrophorétique.

D'autres substrats :

. Iodure de butyryle thiocholine (Sigma)

. Iodure d'acétyle thiocholine (Sigma)

sont utilisés pour la caractérisation des cholinestérases sériques.
Les fractions protéiques sont révélées par le bleu Coomasie ; les lipoprotéines migrent en gel à 3 pour 100 d'acrylamide, et sont colorées par le noir Soudan (185).

La migration concomittante de plusieurs sérums sur un même gel permet la caractérisation - après découpage du gel et coloration spécifique - des protéines, des lipoprotéines et des estérases.

Les estérases seront recherchées également après fractionnement des sérums par le sulfate d'ammonium (33% et 50% de saturation).

- Certains sérums seront étudiés avant et après délipidation par extraction chloroformique.

Enfin, pour les études d'inhibition, les inhibiteurs classiques des estérases dont la liste suit, seront utilisés :

- Chaleur
- Eserine base

- Prostigmine
- Acétate de cuivre

RESULTATS :

L'acétate de β naphtyle - qui permet de mettre en évidence le plus grand nombre d'estérases carboxyliques - et l'acétate d'indoxyle sont les substrats princeps de ce travail.

Pour répertorier les fractions estérasiques nous avons préféré à la classification d'AUGUSTINSSON (17) : Esterases A (arylesterases) Esterases B (esterases aliphatiques, lipases) Esterases C (cholinesterases) une classification fondée sur la position des isoenzymes après migration électrophorétique du sérum - adaptation d'un travail de HUNTER et STRACHAN sur les estérases de souris (93).

Les constituants estérasiques (A, B, C, D, D', E) décelés dans le sérum du rat normal sont distincts : leur vitesse de migration est différente, leur pouvoir enzymatique n'est jamais similaire.

L'ensemble de ces constituants n'est pas toujours présent dans le sérum du rat cancéreux, comme en témoigne le tableau suivant :

Substrat : acétate de β naphtyle	Rats Témoins	Rats cancéreux aflatoxine	Rats cancéreux aflatoxine	Rats Témoins	Substrat : acétate d'indoxyle
Fraction A (Zone des α2 globulines)	94 +	93	100	86	Fraction A
B (zone des α2 - β 2 globulines)	69	46	100	100	B
C (zone des postalbumines) (α I globulines)	100	29	25	100	C
D D' (zone des albumines)	100	95	100	100	D D'
E (zone des préalbumines)	74	47	100	100	E

+ - Ces résultats sont exprimés en pourcentage.

L'examen de l'électrophorégramme des sérums de rats intoxiqués nous a permis également de décrire une bande étendue et estompée que nous avons dénommée F.. Elle apparaît dès B et s'arrête avant C.. Nous l'avons observé à la lecture des électrophorèses du sérum de 57 % des animaux soumis au régime toxique.

Cependant la fraction C est la plus caractéristique; permanente dans le sérum du rat normal elle est retrouvée dans 28 % et 25 % des sérums de rats cancéreux lorsque l'on utilise respectivement l'acétate de β naphtyle et l'acétate d'indoxyle comme substrat.

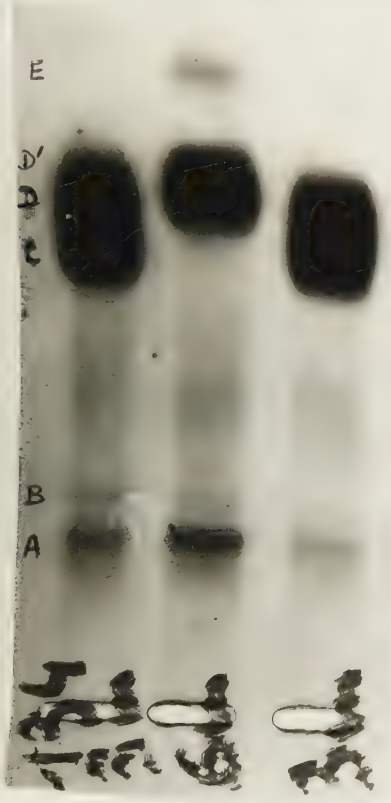


Fig. 1 A

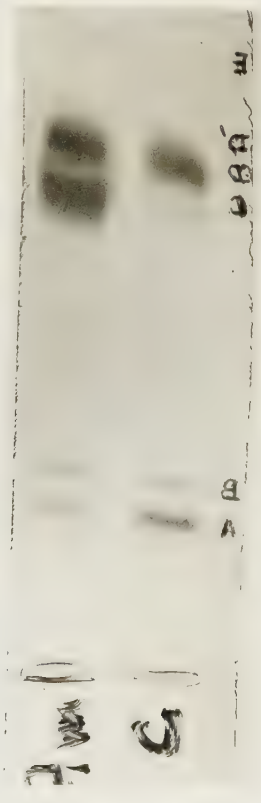


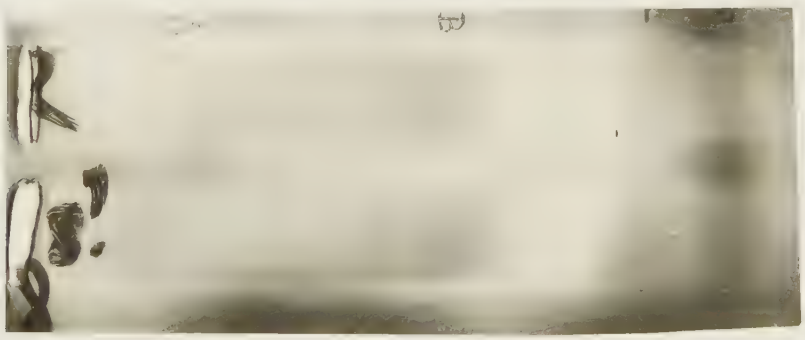
Fig. 1 B

Fig. 1 A - Substrat : acétate de β naphtyle. Au centre : sérum de rat cancéreux. A droite et à gauche : sérum de rat normal.
Fig. 1 B - Substrat : acétate d'indoxyle. A droite : sérum de rat cancéreux. A gauche : sérum de rat normal.

L'iodure de butyryle thiocholine est le substrat type des cholinestérases sériques.

La réaction d'hydrolyse cholinestérase-substrat est révélée par les sels de tetrazolium NBT et INT. Il apparaît des dérivés insolubles de formazan; les différentes fractions cholinestérasiques caractérisées sont colorées en rose.

On peut ainsi décrire de la cathode à l'anode, une zone d'activité cholinestérasique dénommée A très étirée, diffuse, estompée, terminée par une tâche plus dense dénommée B (zone des α I - β I globulines) à forte activité enzymatique puis en fin de migration 2 tâches C et D, peu perceptibles et peu fréquentes, qui sont difficiles à classer.



. Caractérisation des cholinestérases sériques.
Réservoir supérieur : sérum de rat normal.
Réservoir inférieur : sérum de rat cancéreux.

La caractérisation des électrophorégrammes des sérums de rats cancéreux révèle une zone A fortement colorée pour 80% des animaux étudiés, ce qui donnerait à penser que le sérum de ces rats est plus riche en cholinestérases que le sérum des rats normaux.

Ce caractère apparemment paradoxal serait à préciser lors des études quantitatives.

. ETUDE DES INHIBITIONS ENZYMATIQUES

Le substrat utilisé ici est l'acétate de β naphtyle. On observe sucessivement que :

1) Les sérums normaux et cancéreux soumis à des températures de 60° pendant 1 heure et 2 heures perdent toutes leurs propriétés estérasiques.

2) Les zones d'activité estérasique A et B disparaissent lorsque les plaques d'électrophorèse sont immergées dans une solution à 20 mg ou à 40 mg d'ésérine pour 25 ml de tampon phosphate pH = 7,4.

. Si 4 ml de sérum sont incorporés à 12 ml de solution comprenant 10 ou 20 ou 300 mg d'ésérine pour 25 ml de tampon, l'intensité de coloration des fractions estérasiques se trouve diminuée, mais les fractions sont néanmoins présentes dans tous les sérums.

3) Lorsque les plaques d'électrophorèse sont immergées dans un bain d'acétate de cuivre M 10^{-3} ou lorsque 4 ml de sérum sont incorporés à 12 ml de solution d'acétate de cuivre M 10^{-3} ou M 10^{-2}, les sérums normaux et cancéreux comportent encore les fractions spécifiques précitées.

Selon la concentration en acétate de cuivre utilisée il peut exister cependant une inhibition partielle; ainsi habituellement, pour la concentration

M 10^{I} la fraction A disparaît, l'inhibition partielle touche la fraction B et ceci quel que soit le sérum de rat étudié.

4) Un bain à 1,5 mg de prostigmine dans 25 ou 50 ml de tampon phosphate pH à 7,4 provoque la disparition des constituants A et B du sérum de tous les animaux.

- Fractionnement des sérums

Après précipitation par le sulfate d'ammonium à 33% des sérums de rats intoxiqués et des sérums de rats témoins, les réactions estérases-substrat sont bien moins intenses - Les zones A et B notamment sont à peine visibles.

Par contre, l'activité estérasique de la zone C D D' semble majorée lorsque les sérums sont précipités par le sulfate d'ammonium à 50%.

- Délipidation des sérums

La délipidation comporte comme conséquence habituelle la disparition des fractions A et B pour la majorité des prélèvements (92 %) ; l'activité estérasique des fractions C D D', diminuée, est encore notable pour les surnageants à 20 % de chloroforme.

La localisation des lipoprotéines colorées par le noir Soudan sur les électrophorégrammes, ainsi que les résultats de la délipidation des sérums, nous font suggérer que les fractions A et B comportent essentiellement des lipoprotéines.

L'aflatoxine provoque donc la disparition d'une fraction estérasique dans le sérum du rat cancéreux porteur d'un hépatocarcinome.

AINSI DONC, POUR TOUTES LES RAISONS PRECEDEMMENT EXPOSEES L'AFLATOXINE PEUT-ETRE CONSIDEREE COMME UN INHIBITEUR PARTIEL DE LA BIOSYNTHESE PROTEIQUE, ce que corroborent d'ailleurs les observations bicchimiques suivantes :

. OBSERVATIONS BIOCHIMIQUES :

Dans les premières heures de l'intoxication, selon Clifford et Coll (51), l'inhibition de la synthèse protéique est incomplète ; elle est cependant suffisante pour provoquer la nécrose cellulaire.

D'après Moule et Coll (126) dysfonctionnement et inhibition peuvent s'expliquer soit par l'interaction de l'aflatoxine avec l'ADN et l'ARN polymérase, soit par la modification de l'activité modèle de l'ADN (52).

La première hypothèse, encore à l'étude, discutée (126) rend la seconde plus probable car :

- In vitro, le spectre d'absorption UV de l'Aflatoxine BI se modifie dès la mise en présence du toxique avec un ADN (52, 163).

- In vivo et chez le rat adulte, de Recondo et Coll (149) constatent l'inhibition de la synthèse de l'ADN par l'Aflatoxine B1 au cours de l'hypertrophie compensatrice qui suit une hépatectomie partielle.

- Enfin, le pouvoir inhibiteur de l'aflatoxine dans la synthèse des acides nucléiques est démontré : une injection intrapéritonéale minimun de 50 µg d'aflatoxine inhibe en 20 minutes la presque totalité de l'ARN nucléolaire.

Si l'on estime à 20 mg environ la teneur en ADN du foie d'un rat, la quantité de toxique fixé à l'ADN n'excédera pas alors une molécule pour 100 ou 10 000 nucléotides.

Cependant les perturbations sont considérables (102) :

a) Le régime qui comporte une dose expérimentale non léthale d'aflatoxine provoque des déséquilibres dans les ARN synthétisés (100, 101). L'inhibition de la synthèse de l'ARN est rapide; l'inhibition première se manifeste au niveau des ARN lourds.

- Les synthèses de l'ARN profondément perturbées, la synthèse protéique dépendante est modifiée.

b) Ce sont les molécules à longues chaines qui sont les premières inhibées :

- L'aflatoxine se fixe sur la molécule de chromatine; il s'agit probablement d'une fixation directe, d'un "collage" électif en certains points précis de l'ADN.

- La molécule d'ADN ainsi scindée, la copie ARN dépendante est lésée.

- Plus les sites occupés par le toxique sont nombreux, plus les espaces nécessaires à la transcription diminuent.

- La transcription devient impossible quand les distances libres sur la molécule d'ADN, trop courtes, sont impropres au fonctionnement normal des unités de transcription (gêne opérateur, gênes de structure, facteurs σ et ρ, ponctuations ...) Toute synthèse alors s'arrête.

Ainsi quand la qualité du codage est altérée par l'aflatoxine la biosynthèse protéique dépendante est perturbée. Des fractions antigéniques qui ont leur rôle dans le métabolisme général du rat sont désormais perdues (alpha 1 globuline) (120) ; elles peuvent être remplacées par les fractions voisines normales, visibles en A.I.E., qui camouflent et compensent la perte quantita-

tive.

Cependant ces dernières fractions de par leurs propriétés physicochimiques et de par leur structure moléculaire notamment, ne peuvent avoir exactement même fonction.

Un mécanisme intime de la synthèse protéique défectueux, là est - selon nous - la genèse essentielle des amaigrissements constatés.

Toutes les méthodes de détoxification, qui peuvent libèrer les unités de transcription bloquées, vont permettre la reprise des activités de synthèse de l'A.D.N.

Chronologiquement c'est pourtant les synthèses de l'ARN qui retrouvent leur intégrité les premières; celles de l'ADN restent plus longtemps inhibées. Il faut ajouter que les sites, bloqués par l'aflatoxine, la duplication ne se fait pas; la transcription s'accomplit néanmoins car la quantité de l'ADN nécessaire et disponible est bien suffisante.

La détoxification achevée, duplication et transcription deviennent possibles. Seuls certains gênes demeurent bloqués et dès lors les cellules filles, apparues au cours de la division cellulaire, sont pourvues de délétions. Délétions mineures elles passent inaperçues, léthales elles provoquent l'hécatombe des élevages, localisées sur les gênes régulateurs de l'homéostasie cellulaire elles induisent le cancer (102).

Ainsi l'aflatoxine provoque des perturbations œnsidérables du métabolisme protéique. Il faut savoir cependant que :

I - La perte de poids de l'animal agressé ne peut se représenter par une courbe linéaire.

. Dans un élevage expérimental intoxiqué certains rats sont robustes, vifs, attentifs. Leur poids moyen, au 11e mois d'ingestion d'aflatoxines, peut dépasser celui d'un animal témoin de même âge.

. La consommation alimentaire mensuelle moyenne de ces rongeurs excède parfois la consommation des rats normaux, comme si la pollution stimulait l'appétit des animaux agressés. Dès lors leur taux protéique sérique global ne s'infléchit guère et leur protéinogramme, paranormal, n'étonne pas.

II - Les amaigrissements ne sont pas toujours contemporains du développement de la tumeur néoplasique; cependant le rat atteint d'une alopécie, inactif, précachectique, est souvent un sujet cancéreux.

Par ailleurs, pour une même dose d'aflatoxines ingérée la susceptibilité de l'animal varie :

a) en fonction du sexe :

- Si 60 à 90% des rats mâles amaigris constituent des hépatocarcinomes souvent monstrueux après un an d'intoxication, 20% des femelles développent des tumeurs malignes sous le couvert d'un bon état de santé apparent et d'un équilibre staturo-pondéral bien conservé (123).

b) en fonction de la résistance individuelle des animaux dont nous connaissons peu.

- C'est ainsi que des doses quotidiennes d'aflatoxine ingérées pendant 8 mois par des lots de rats mâles, provoquent la misère physiologique de 90% des animaux. Cependant 10% de leurs congénères ne semblent pas incommodés.

- De plus 25% des sujets sont indemnes de cancer hépatique et tous ne succombent pas d'hépatite nécrosante.

Clifford et Coll. (52)ont suggèré que de telles variations à l'intérieur d'une espèce témoignaient de l'affinité particulière du toxique pour certains ADN.

La multiplicité et la disparité des lésions dépendraient donc de la qualité du "terrain"agressé. Elles dépendraient aussi des espèces animales expérimentales choisies.

Les poulets, les souris, les veaux et les moutons, sont très résistants à l'intoxication et ne constituent que des lésions parenchymateuses banales et dissemblables.

- Par contre les bilans alimentaire et lésionnel des rongeurs (rats) et des primates (cynocéphales) (118) intoxiqués (hépatite nécrosante, atrophie testiculaire, exception faite des hépatocarcinomes non retrouvés chez le singe) sont similaires; similaires à ce point que sans interpoler à l'homme, l'on peut craindre pour tout individu menacé par l'intoxication aspergillaire.

CHAPITRE IX

BIOSYNTHESE DES CETOSTEROIDES

SOUS L'EFFET DE L'INTOXICATION PAR LES AFLATOXINES

- Nous savons que des rats mâles Wistar Commentry qui reçoivent depuis le sevrage un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxine présentent au 14ème mois d'expérimentation :
  - des carcinomes hépato ou cholangiocellulaires parfois associés (60 à 90 % des animaux),
  - des lésions testiculaires (10 à 35 % des animaux) comprenant :
    - atrophie testiculaire avec régression de toute la lignée germinale et prolifération sertolienne,
    - persistance d'un état embryonnaire du testicule
    - raréfaction des cellules interstitielles.

La structure des glandes surrénales (cortico et médullosurrénale) est conservée.

- A chaque lésion tissulaire correspond un dysfonctionnement des cellules altérées ainsi toute cellule endocrine lésée peut avoir son activité hormonale perturbée.

- La découverte des lésions testiculaires et hépatiques nous a fait supposer que le métabolisme des androgènes - en particulier celui des 17 cétostéroides - pouvait être modifié.

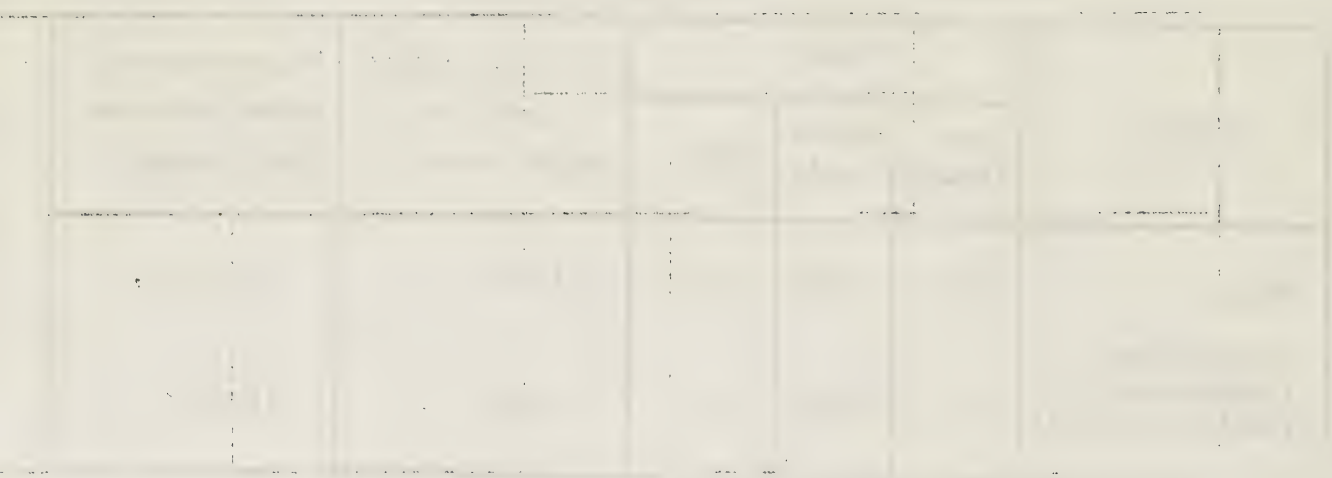
- Le dosage des 17 cétostéroïdes urinaires se pratique notamment selon la réaction de Silber et Porter (161), le dosage des 17 hydroxycorticoïdes selon la réaction de Cahen et Salter (39) d'après Henry et Thévenet (83) (cf page 56 et 60).

I - RESULTATS

- La différence des taux de 17 cétostéroïdes urinaires des séries de rats appariés - rats intoxiqués, rats témoins de même âge - est significative comme en témoigne le tableau suivant.

- Le taux des 17 hydroxycorticoïdes n'est donné qu'à titre documentaire.

Régime	Rats			17 cétostéroïdes urinaires (µg/24 h/rat)	17 hydroxycorticoïdes urinaires (µg/24 h/rat)
	Age (mois)	Poids moyen	Nombre		
Normal	13,5	190 g	45	13,60	9,85
Contaminé par l'aflatoxine (pendant 14 mois)	13,5	180 g	48	28,86	11,07



La variation du taux des 17 cétostéroïdes urinaires est remarquable, dès le 10ème mois d'ingestion d'aflatoxines (21,2 µg/24 heures/rat).

Les valeurs moyennes et les valeurs extrêmes des taux hormonaux sont colligées :

- 17 cétostéroïdes :
  rats témoins : 15,4 µg, 13,60 µg, 12,30 µg,
  rats aflatoxine : 32,1 µg, 28,86 µg, 24 µg,
- 17 hydroxycorticoïdes :
  rats témoins : 10,60 µg, 9,85 µg, 9,10 µg,
  rats aflatoxine : 16,1 µg, 11,07 µg, 7,7 µg.

L'importance en volume de l'atrophie testiculaire (un quart ou un tiers ou une moitié de testicule) n'implique pas l'importance de la variation hormonale.

II - HYPOTHESE ET DISCUSSION

L'augmentation du taux des 17 cétostéroïdes urinaires ne dépend pas d'un apport exogène. Les cultures d'Aspergillus flavus, utilisées pour contaminer le régime alimentaire commercial standard, ne contiennent - au 20ème jour de croissance sur milieu de Brian liquide - jamais plus de 0,8 mg/l de 17 cétostéroïdes et de 0,3 mg/l de 17 hydroxycorticoïdes.

De plus, le tourteau toxique et cancérigène obtenu est stérilisé à 140°C; les aflatoxines demeurent mais les hormones sont détruites.

L'augmentation en 17 cétostéroïdes peut dépendre alors :

b) d'un dysfonctionnement cortico-surrénalien.

- Bien que les glandes surrénales, qui élaborent une grande partie des androgènes, paraissent histologiquement normales, l'on ne peut affirmer cependant l'intégrité des sécrétions endocrines.

- Le test de stimulation par la gonadotrophine chorionique ne renseigne pas sur l'état physiologique des cellules; en effet, si l'injection de gonadotrophine stimule une glande endocrine testiculaire fonctionnelle, la glande surrénale ne répond jamais à cette stimulation.

- Le taux des 17 hydroxycorticoïdes est le plus souvent normal. Dans le cas présent il ne semble pas y avoir d'interdépendance entre les deux sécrétions.

c) un dysfonctionnement hépatique provoqué par les multiples lésions toxiques et néoplasiques rapportées ci-dessus, nous paraît la cause principale de l'hypersécrétion des 17 cétostéroïdes.

Nous savons que les 17 cétostéroïdes et les 17 hydroxycorticoïdes sont excrétés par voie urinaire sous forme conjuguée : sulfoconjuguée et glycuronoconjuguée.

Mais il existe également une fraction hormonale libre. Elle serait éventuellement augmentée lors d'une insuffisance hépatique pour la conjugaison. Une fonction rénale perturbée pourrait expliquer

L'augmentation en 17 cétostéroïdes peut dépendre alors :

b) d'un dysfonctionnement cortico-surrénalien.

- Bien que les glandes surrénales, qui élaborent une grande partie des androgènes, paraissent histologiquement normales, l'on ne peut affirmer cependant l'intégrité des sécrétions endocrines.

- Le test de stimulation par la gonadotrophine chorionique ne renseigne pas sur l'état physiologique des cellules; en effet, si l'injection de gonadotrophine stimule une glande endocrine testiculaire fonctionnelle, la glande surrénale ne répond jamais à cette stimulation.

- Le taux des 17 hydroxycorticoïdes est le plus souvent normal. Dans le cas présent il ne semble pas y avoir d'interdépendance entre les deux sécrétions.

c) un dysfonctionnement hépatique provoqué par les multiples lésions toxiques et néoplasiques rapportées ci-dessus, nous paraît la cause principale de l'hypersécrétion des 17 cétostéroïdes.

Nous savons que les 17 cétostéroïdes et les 17 hydroxycorticoïdes sont excrétés par voie urinaire sous forme conjuguée : sulfoconjuguée et glycuronoconjuguée.

Mais il existe également une fraction hormonale libre. Elle serait éventuellement augmentée lors d'une insuffisance hépatique pour la conjugaison. Une fonction rénale perturbée pourrait expliquer

RESUME ET CONCLUSIONS

Les résultats des recherches qui viennent d'être exposées mettent en évidence :

1°) - La fréquence et l'importance des contaminations fongiques aspergillaires.

. Parmi les Aspergillus responsables, A. flavus revêt une importance considérable car il élabore diverses aflatoxines toxiques et cancérigènes et paraît s'adapter aux substrats les plus divers.
Sa présence a été signalée non seulement sur la majorité des produits vivriers végétaux, mais aussi sur des denrées alimentaires d'origine animale.

2°) - L'agressivité toute particulière de l'Aflatoxine B1

. La grande toxicité de ce composé se manifeste avec plus d'acuité chez les tous jeunes animaux. La DL 50 pour le rat nouveau-né âgé d'un jourest de 1mg/kg de poids vif ; elle est seulement de 18 µg pour le jeune caneton de 50 grammes.
Cette Aflatoxine est également mille fois plus active que tous les cancérigènes hépatiques précédemment connus.
Des méthodes chromatographiques originales et des tests biologiques de survie des canetons intoxiqués, permettent de caractériser les propriétés physico-chimiques et les propriétés biologiques des aflatoxines.

3°) - La toxicité aigüe des aflatoxines au niveau hépatique et extra-hépatique.

. Ces molécules toxiques sont d'autant plus dangereuses, après absorption buccale, qu'elles traversent aisément le tube digestif des animaux pour s'accumuler rapidement au niveau du foie. Les animaux agressés - les palmipèdes notamment - constituent alors des lésions hépatiques multiples et diverses tumeurs néoplasiques. C'est ainsi que le caneton d'un jour, à qui l'on administre un extrait d'aliment fortement concentré en aflatoxines, présente rapidement des lésions hépatiques pathognomoniques de l'agent toxique. Il s'agit :

- de phénomènes prolifératifs cellulaires qui s'organisent autour de l'espace porte sous la forme d'une couronne cellulaire radiaire constituée d'éléments basophiles plus ou moins différenciés.
- de nécrose le plus souvent mal systématisée, complète ou incomplète, dans le parenchyme hépatique.

Ce dernier type de lésion fréquemment rencontré chez le caneton, l'est beaucoup moins chez le rat adulte intoxiqué dès le sevrage; l'aspect cirrhotique du foie observé chez quelques rats doit être interprété comme la résultante des processus de nécrose.

Le rat peut succomber à l'issue de l'apparition de cancers hépatiques. Sur le plan histologique ces cancers, reconnus chez 75 % environ des animaux, sont des carcinomes hépato-cellulaires ; les rares formes cholangiocellulaires se développent au sein d'une stroma-réaction fibreuse importante.

Les lésions hépatiques associées aux processus tumoraux sont la fibrose, les nodules d'adénomatose et de régénération, l'adénofibromatose biliaire kystique, les foyers de prolifération biliaire, les lésions dégénératives et nécrotiques et les infiltrats inflammatoires.

- Parmi les lésions extrahépatiques, il faut signaler tout d'abord des lésions testiculaires considérables - Chez 20 % des rongeurs pubérés intoxiqués, le testicule reprend un état embryonnaire, la lignée germinale régresse, les cellules intersticielles de la glande endocrine se raréfient.

- Au nombre des altérations hyperplasiques on note assez fréquemment l'apparition de lésions gastriques papillomateuses, ulcératives ou hémorragiques, d'un adénocarcinome glandulaire massif des glandes salivaires sous-maxillaires ou d'un sarcome fuso-cellulaire sous-cutané.

Les lésions pulmonaires, notamment les métastases nodulaires des carcinomes hépatocellulaires, ne sont pas rares.

Par contre les métastases rénales des carcinomes hépatiques sont exceptionnelles. Nous avons pu observer de gros nodules adénomateux éosinophiles intraparenchymateux, accompagnés ou non de fibrose.

L'apparition et la pérennité de toutes ces lésions dépendent de l'importance de l'apport toxique, de l'espèce animale expérimentale, de

l'âge des animaux et de la composition du régime alimentaire.

Il faut signaler "in fine" qu'un ralentissement de croissance d'importance variable est contemporain de l'évolution de ces lésions. Un exemple typique - entre autres - est fourni par le jeune rat dont le développement pondéral est profondément perturbé au cours de l'intoxication chronique.

4°) - Des perturbations du métabolisme protéique des rongeurs agressés.

La cancérisation des divers parenchymes sera toujours plus discrète et plus lente à apparaître que les altérations spectaculaires de l'état général, ou encore, que les dysfonctionnements habituels de la biosynthèse protéique des animaux étudiés. Ainsi des rats mâles Wistar Commentry âgés de 11 mois, qui ingérent depuis le sevrage un régime contaminé à 0,75 ppm d'aflatoxines impures, présentent un ralentissement considérable du rythme de croissance pondérale.

Ce ralentissement peut partiellement s'expliquer par l'inappétence des rongeurs intoxiqués comme le prouve l'étude des bilans azotés (C.U.D. - C.R.A.)

Le dysfonctionnement chronique éventuel des organes de la sphére digestive, ainsi que les rares lésions découvertes au niveau des

glandes endocrines, paraissent en partie responsables du mauvais état général permanent observé au cours des intoxications.
Nous avons pu démontrer l'importance du dysfonctionnement ou de l'inhibition de la biosynthèse protéique dans le processus de la perte pondérale :
A - L'analyse immunoélectrophorétique prouve que les aflatoxines provoquent l'exclusion d'une séquence antigénique protéique au cours de la transformation maligne de la cellule hépatique. Le constituant protéique disparu est une globuline migrant chez le rat normal dans la zone des alpha 1 globulines.
De plus, les aflatoxines ne sont jamais des agents de synthèse protéique nouvelle à l'encontre de nombreux hépatotoxiques cancérigènes comme le 2 acétyl -amino-fluorène. Dans le sérum des rats intoxiqués et cancéreux, les néo-antigènes caractéristiques des processus de cancérisation expérimentale sont constamment absents.
Une autre originalité des substances hépato-cancérigènes (D.A.B. - 3 M'DAB) est leur propriété de "déréprimer" des antigènes embryonnaires, antigènes identiques à ceux découverts dans les sérums des embryons de rats ou de rattes gestantes.
Les aflatoxines ne peuvent réaliser la facile dérépression de ces protéines et notamment l'alpha 2 glyco-protéine embryonnaire,

protéine "d'alarme" très constante au cours de multiples agressions.

B - La migration en gel d'agarose acrylamide, substance à grand pouvoir de résolution permettant d'étudier les propriétés enzymatiques des sérums de rats intoxiqués, a servi à prouver que les aflatoxines provoquent la disparition d'une fraction estérasique dans le sérum du rat cancéreux porteur d'un hépatocarcinome.
L'ingérence des aflatoxines dans la biosynthèse protéique est donc éloquente. Son mécanisme semble avoir été précisé par de récentes données biochimiques mettant en cause la fixation élective du toxique en certains sites bien précis de la molécule d'ADN. De ce fait la structure de la molécule d'ADN se trouverait modifiée. La copie ARN dépendante, et par là même la synthèse protéique, refléteraient ces modifications.

5°) - Les modifications de la sécrétion des hormones androgènes
La présence de taux élevés de 17 cétostéroïdes dans les urines des rats intoxiqués dépendrait davantage d'une insuffisance de l'efficacité de la fonction de conjugaison hépatique que d'un dysfonctionnement de la glande endocrine du testicule ou de la cortico-surrénale.

Toutes ces constations présentent l'intérêt majeur de caractériser la virulence de l'aflatoxine.

On peut se demander dans quelle mesure ce toxique, décelé principalement dans les denrées alimentaires tropicales, intervient dans la genèse des cancers primitifs du foie en Afrique.

Des enquêtes mériteraient d'être entreprises pour élucider ce problème.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ADRIAN J., JACQUOT R.
Valeur alimentaire de l'arachide et de ses dérivés
Ed. GP Maisonneuve et Larose : 11, Rue Victor Cousin - Paris V - 1968

2 - ADRIAN J., JACQUOT R.
Valeur alimentaire de l'arachide et de ses dérivés - 168 - Chapître IV : 127
GP Maisonneuve et Larose : 11, Rue Victor Cousin - Paris V

3 - ADRIAN J., JACQUOT R.
Valeur alimentaire de l'arachide et de ses dérivés - 1968 - Chapître IV : 145, 149, 150, - GP Maisonneuve et Larose : 11, Rue Victor Cousin - Paris V

4 - ADYE J., MATELAS R.I.
Biochem. Biophys. Acta.-1964, 86 : 418

5 - ALLCROFT R., CARNAGHAN R.B.A., SARGEANT K., O'KELLY M.A.
Vet. Rec.-1961 - 73 : 28

6 - ALLCROFT R., CARNAGHAN R.B.A.
Vet. Rec.-1962, 74 : 863

7 - ALLCROFT R., CARNAGHAN R.B.A.
Vet. Rec.-1963, 75 : 259

8 - ALLCROFT R., ROGERS H., LEWIS G. NABNEY J. BEST P.E.
Nature - 1966, 209 : 154

9 - ALLEN S.L.
Genetics-1960, 45 : 1051

10 - ARCHIBALD R.M.C.G., SMITH H.J., SMITH J.D.
Canad. Vet. J.-1962-3 : 322

11 - ASAO T., BUCHI G., ABDEL KADER M.M., CHANG S.B., WICK E.L., WOGAN C.N.
J. Amer. Chem. Soc.-1963, 85 : 1706

12 - ASHLEY L.M.
Fed. Proc.-1962, 21,: 304

13 - ASHLEY L.M., HALVER J.E., WOGAN G.N., GARDNER W.K.
Fed. Proc.-1964, 23 : 105

14 - ASHLEY L.M., HALVER J.E., GARDNER W.K.
Fed. Proc.-1965, 24 : 627

15 - ASPLIN F.D., CARNAGHAN R.B.A.
Vet. Rec.-1961, 73 : 1215

16 - AUBERTIN E., DANGOUMEAU A., CASTAGNOU R.
J. Physiol. Pathol. Gener.-1943, 38 : 282

17 - AUGUSTINSSON K.B.
Nature-1958, 181 : 1786

18 - AUSTWICK P.C.K., AYERST G.
Chem. and Ind.-1963, 55

19 - AUSTWICK P.K.C.
Examen mycologique des grains d'arachide - Communication personnelle - Central Veterinary Laboratory. Wey-bridge - London

20 - AVRAMEAS S., THERNYNCK T.
J. Biol., Chem.,-1967, 242 : 1951

21 - AVRAMEAS S., TERNYNCK T.
Immunochemistry - 1969, 6 : 53

22 - AYCARDI J., CALET C.
Industr. Aliment. Animales Fr.-1966, 35 : 37

23 - BARNES J.M., BUTLER W.H.
Nature - 1964, 202 : 1016

24 - BARRY A., WOMONIN L., DE WORONIN L.
Cité par RAPER K.B., FENNELL D.I. dans : the genus Aspergillus - Edité par the Williams and Wilkins Company - 428 E. Preston Street Baltimore , Md 21202 - U.S.A.

25 - BLAKESLEE A.F.
Phytopathology-1915, 5 : 68-69 (plate VII)

26 - BIGUET J., TRAN VAN KY P., CAPRON A., FRUIT J.
C.R. Acad. Sci.-1962, 254 : 3768

27 - BIGUET J., TRAN VAN KY P., ANDRIEU S., FRUIT J.
Ann. Inst. Pasteur - 1964, 106 : 72

28 - BLOUNT W.P.
Vet. Rec.-1960, 72 : 786

29 - BLOUNT W.P., FRASEE D., KNIGET D., DOWLING W.M.
Vet. Rec.-1963, 75 : 350

30 - BOYDEN S.V.
J. Exp. Med.-1951, 93 : 107

31 - BRIAN P.W., DAWKINS A.W., GROVE J.F., HEMMING H.G., LOWE D., NORRIS G.L.F.
Exptl. Botany-1961 - 12 : 1

32 - BULL L.
Aust. Vet. J. - 1954, 31 : 33(cité par LOOSMORE et MARKSON)

33 - BUTLER W.H.
The Bristish Journal of Cancer - 1964, 18 : 756

34 - BUTLER W.H., CLIFFORD J.I.
Nature - 1965, 206 : 1045

35 - BUTLER W.H.
The Journal of Pathology and Bacteriology-1966, 91 : 277

36 - BUTLER W.H., BARNES J.M.,
Nature - 1966, 209 : 90

37 - BUTLER W.H. , BAKER J.E.
Nature,-1965, 205 : 1319

38 - CABANNES et COLL.
Manuel technique pour l'étude des hémoglobinopathies et maladies apparentées - Centre régional de transfusion sanguine et d'hématologie - Toulouse 1967

39 - CAHEN R.L., SALTER W.T.
J. Biol. Chem.-1944, 152 : 489

40 - CAHNMANN H.J., KURATSUNE M.
Anal. Chem.-1957, 29 : 1312

41 - CALVET H., BOUDERGUES R., DISCACCIATA E., CLICHE M.
Rev. Élèv. Med. Vet. Pays Trop.-1966, 19 : 545

42 - CAMPBELL J.C.
Proc. Royal Society Edinburgh - 1957, 66 : 111

43 - CARLL W.T., FORGACS J., HERRING A.S., MAHLANDT B.G.
Vet. Med.-1955, 50 : 210

44 - CARNAGHAN R.B.A., SARGEANT K.
Veterinary Record - 1961, 73 : 726

45 - CARNAGHAN R.B.A., HARTLEY R.D., O'KELLY J.
Nature - 1963, 200 : 1101

46 - CARNAGHAN R.B.A.
Nature - 1965, 208 : 308

47 - CARRUTHERS C., BAUMLER A.
Archs. Biochem. Biophys. 1962, 99 : 458

48 - CHANG S.B., ABDEL KADER M.M., WICK E.L., WOGAN G.N.
Science - 1963, 142 : 1191

49 - CHAUVEAU J., MOULE Y., ROUILLER C., SCHNEEBELI J.
J. Cell . Biol. 1962, 12 : 17

50 - CLEGG F.G., BRYSON H.
Vet. Rec. 1962, 74 : 992

51 - CLIFFORD J.I., REES K.R.
Biochem J. 1967, 102 : 765

52 - CLIFFORD J.I., REES K.R., STEVENS M.E.M.
Biochem.J. 1967, 103 : 258

53 - CLIFFORD J.I., REES K.R.
Nature 1966, 209 (5020) : 312

54 - CUCULLU A.F., LEE L.S., MAYNE R.Y. GOLDBLATT L.A.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 1965 - 42, 151 A; 1966, 43 : 89

55 - CZAPEK F.
Chem. Physiol. U Pathol. 1002, 1 : 540 - 560; 1903, 3 : 47-66 (cité par RAPER K.B., FENELL D.I.)

56 - DE IONGH H., VLES R.O., VAN PELT J.G.
Nature - 1964, 202 : 466

57 - DE IONGH H., VAN PELT J.G., ORD W.O., BARRETT C.B.
Vet. Rec. 1964, 76 : 901

58 - DE TRAVERSE P.M., COQUELET M.L., PECHERY C.
Detéction des anomalies de l'hémoglobine en pratique courante - 1969.
Institut de Biologie clinique de l'Université de Paris - Hôpital Cochin - Paris - Ed. CDU

59 - DIENER U.L., DAVIS N.D., SALMON W.D., PRICKETT C.O.
Science 1963, 142 : 1492

60 - DIENER U.L., DAVIS N.D.
Phytopathol. 1966, 56 : 1390

61 - DIENER U.L., DAVIS N.D.
J. Amer. Oil Chem. Soc 1967, 44 : 259

62 - DONALD D.M.C., A'BROOK J.
Trop. Science - 1963, 5 : 208

63 - DONALD D. Mc, HARKNESS C.
Trop. Science 1963, 5 : 143

64 - DONALD D. Mc., HARKNESS C.
Trop. Science 1964, 6 : 12

65 - DORP D.A. Van, VAN DER ZIDJEN A.S.M., BELTHUIS R.K. SPARREBOOM S., ORD W.O., DE JONG K., KEUNIG R.
Rec. Trav. Pays-Bas - 1963, 82 : 587

66 - DOX A.W.
U.S. Dept. Agr. Bur. Anim. Ind. Bull. 1910-nº 120 - 170 pp

67 - DUFOUR D., BRASSARD A., TREMBLAY A., LEMIEUX S.
Path. et Biol.-1967, 15 : 757

68 - ENGLEBRECHT R.H., AYRES J.L., SINNHUBER R.O.
J. Assos. Off. Agric. Chem.-1965, 48 : 815

69 - FORCAGS J., CARLL W.T., HERRING A.S., MAHLANDT B.G.
J. Hyg.-1954, 60 : 15

70 - FRAYSSINET C., LAFARGE C.
Symposium aflatoxines-Villejuif, mars 1966

71 - FRAYSSINET C., LAFONT P.
Cahier nutrit. Dict.-1966, 1 : 21

72 - GABLIKS J., SCHAEFFER W., FRIEDMAN L., WOGAN G.N.
J. Bacteriol.-1965, 90 : 720

73 - GOUTIER R., GOUTIER S., PIROTTI M.
Biochim. Biophys Acta-1955, 16 : 366

74 - GRABAR P., BURTIN P.
Analyse immunoélectrophorétique 1960 - Masson et Cie Editeurs
120 Boulevard Saint Germain Paris VI

75 - GRABAR P., WILLIAMS C.A. Jr
Biochem. Biophys. Acta. 1965, 17 : 67

76 - GRAY W.V.
Vet. Rec. 1961 : 73 : 865

77 - HALL J.N., COWEN P.N.
Nature 1959, 184 : 370

78 - HALPERN B.N., PACAUD A.
C. Rend. Soc. Biol. 1951, 145 : 1465

79 - HALVER J.E.
Proceedings of a symposium held at the Massachussetts Instute of technology, 18-19 march 1964 M.I.T. Press. Cambridge Mass : 209-234

80 - HALVER J.E.
University of Utah Press - Salt Lake City 1966 : 103-112

81 - HARDING J.D.J., DONE J.T., LEWIS G., ALLCROFT R.
Res. Vet. Sci. 1963, 4 : 217

82 - HARTLEY R.D., NESBITT B.F., O'KELLY J.
Nature - 1963, 198 : 1056

83 - HENRY R., THEVENET M.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33 : 1617

84 - HENRY R., THEVENET M.
Ann. Endoc. 1953, 14 : 628

85 - HJORT T.
Lancet - 1961, 1 : 1262

86 - HYORT T., PEDERSEN G.T.
Lancet - 1962, 2 : 259

87 - HODGES F.A., ZUST J.R., SMITH H.R., NELSON A.H., ARMBRECHT B.H., CAMPBELLE A.D.
Science - 1964, 145 : 1439

88 - HOLT S.J., WITHERS R.F.J.
Nature - 1952, 170 : 1012

89 - HOLT S.J.
"Ciba foundation symposium of lysosomes - 1963 - Churchill - London - p. 114

90 - HOLZAPFEL C.W., STEYN P.S., PURCHASE I.F.H.
Tetrahedron letters - Pergamon Press Ltd - 1966, 25 : 2799

91 - HOLZAPFEL C.W., STEYN P.S., PURCHASE I.F.H.
Tetrahedron letters - 1968, 25 : 2799

92 - HUEPER W.C., PAYNE X.X.
A.M.A. Arch. Path. - 1960, 70 : 372

93 - HUNTER R.L., STRACHAN D.S.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1961 - 94 : 861

94 - IONGH de, VLES R.O, VAN PELT J.G.
Nature, 1964, 202 : 466

95 - ISHIZAKA T.
Progress in allergy - Vol. II Edited by P. Kallos and B.H. Waksman, S. Karger - Basel - 1963

96 - JACOB F., MONOD J. -
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1961, 26 : 193

97 - KABAT E.A., MAYER M.M.
Experimental Immuno chemistry - Charles C. Thomas - Springfield 1948.

98 - KRUMHOLZ L.A., RUST J.H.
Arch. Path 1954, 57 : 270

99 - KULIK Y.I.
J. Mikrobiol. kicya 1957, 19 : 36

100 - LAFARGE C., FRAYSSINET C., DE RECONDO A.M.
Bull. Soc. Chim. Biol 1965 , 47 : 1724

101 - LAFARGE C., FRAYSSINET C., SIMARD R.
C.R. Acad. Sc. 1966, 263 : 10

102 - LAFARGE C.

Action de l'aflatoxine sur les synthèses hépatiques d'acides nucléiques du rat. Problèmes posés par la cancérisation. Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences naturelles - Faculté des Sciences de Paris - Nov. 68.

103 - LANCASTER M.C., JENKINS F.F., PHILIP Mcl. J.
Nature - 1961, 192 : 1095

104 - LANCASTER M.C., JENKINS F.F., PHILIP Mcl. J., SARGEANT K., SHERIDAN A., O'KELLY J.
Nature 1961, 192 : 1095

105 - LE BRETON E., BOY J.
Report of the International Congress of Nutrition - Washington September 1960 - 352 : 78

106 - LINK H.F.
Cité par Raper K.B., et Fennell D.I. dans : The genus Aspergillus - Edité par the Williams and Wilkins Company - 428 E. Preston Street Baltimore - Md 21202 - U.S.A.

107 - LOOSMORE R.M., HARDING J.D.J.
Vet. Rec. - 1961, 73 : 1362

108 - LOOSMORE R.M., MARKSON L.M.
Vet. Rec. - 1961, 73 : 813

109 - LOOSMORE R.M., ALLCROFT R., TUTTON E.A., CARNAGHAN R.B.H.
Vet. Rec. - 1964, 76 : 64

110 - MAC CANN W.P.
J. Biol. Chem.- 1957, 226 : 15

111 - MADHAVAN T.V., SURYNARAYANA RAO.K.
Arch. Path.(Chicago)-1966, 81 : 520

112 - MARKERT C.L., MOLLER F.
Proc. Natl. Acad. Sc. - 1959, 45 : 753

113 - MASRI M.S., LUNDIN R.E., PAGE J.R., GARCIA V.C.
Nature - 1967, 215 : 753

114 - MATHE G.
Bull. du Canc. - 1967, 54 : 379

115 - MERWE K.J. Van der, FOURIE L.
Chem. Ind. - 1963 - 12 Oct. : 1960

116 - MERWE K.J. Van der, STEYN P.S., FOURIE L.
J. Chem. Soc. - 1965 (pt V) : 7083

117 - MERWE K.J. Van der, STEYN P.S., FOURIE L., DE SCOTT B., THERON J.J.
Nature-1965 , 205 : 1112 - 5 : 71

118 - MONJOUR L., PRESLES J.M., QUENUM C.
Travaux non publiés

119 - MONJOUR L., TOURY J., MARIAGE C.
Bull. Soc. Sci. Hyg. Alimentaire - 1968, 56 : 229

120 - MONJOUR L., MARIAGE C.
C.R. Soc. Biol. 1969, 163 : 274

121 - MONJOUR L., MARIAGE C.
C.R. Soc. Biol. 1969, 163 : 1261

122 - MONJOUR L., MARIAGE C.
C.R. Soc. Biol. 1969, 163 : 1288

123 - MONJOUR L., QUENUM C., GIORGI R.
Arch. Anat. Path. 1970, 18 : 175

124 - MONJOUR L., OUDART J.L.
Cahiers nutr. Diét - 1970, 5 : 71

125 - MONJOUR L., MARIAGE C.
C.R. Soc. Biol. 1970 (sous publication)

126 - MOULE Y., FRAYSSINET C.
Nature 1968, 218 : 93

127 - MOREAU C., MOREAU M.
Lait 1960, 40 : 512

128 - MOSSERAY R.
La cellule 1934, 43 (Fasc 2) : 203-284 (Plates I-IV)

129 - NESBITT R.F., O'KELLY J., SARGEANT K., SHERIDAN A.
Nature 1962 - 195 : 1062

130 - NEUHAUSS O.W., HAVEZ R., BISERTE G.
Arch. Bioch. Bioph. 1964 - 106 : 159

131 - NEWBERNE P.M., WOGAN G.N., CARLTON W.W., ABDELKADER M.M.
Tox. and appl. Pharm. 1964, 6 : 542

132 - NEWBERNE P.M., RUSSO R., WOGAN G.N.
Path. Vet. 1966, 3 : 331

133 - NINARD (B.) HINTERMANN J.
Bull. Inst. Hyg. Maroc. 1945, 5 : 49

134 - OMACHI A., BARNUM C.P., GLICK D.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1948, 67 : 133

135 - ORNSTEIN L., DAVIS B.J.
J. Histochem. Cytochem. 1959, 7 : 291

136 - OUTCHERLONY B.
Acta Path. Microb. Scand 1949, 26 : 507

137 - PETIT J.P., RIVIERE R., PERREAU P., PAGOT J.,
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1964, 17 : 239

138 - PETIT J.P.
Rev. Elev. Med. Vet. Trop. 1966, 19 : 87

139 - PITOT H.C., HEIDELBERGER C.
Cancer Res. 1964, 23

140 - PITOT H.C., CHO Y.S.
Progr. Exp. Tumor Res. 1965, 7 : 158 - Basel (Switzerland)
Ed. S. Krager

141 - PLATT B.S., STEWART R.J.C., GUPTA R.
Proc. Nutrit. Soc. 1962, 30 : 21

142 - RAPER K.B., FENNELL D.I.
The Genus Aspergillus. Chapter IV - pp 53-54 - Edited by the Williams and Wilkins Company - 428 E. Preston Street. Baltimore - Md. 21.202. U.S.A.

143 - RAPER K.B., FENNELL D.I.
The Genus Aspergillus. Chapître IV, pp 53-54 - Edité par the Williams and Wilkins Company - 428 E. Preston Street - Baltimore Md. 21.202. U.S.A.

144 - RAPER K.B., FENNELL D.I.
The Genus Aspergillus. Chapter XVIII - pp 360 - Edited by the Williams and Wilkins Company - 428 E. Preston Street. Baltimore Md 21.202. U.S.A.

145 - RAYMOND S.
in "Gel Electrophorèsis" - Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964, 121 : 350

146 - RAYMOND W.D.
Food technol. 1966, 20 : 54

147 - RAYNAUD J.P.
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1961, 14 : 429

148 - RAYNAUD J.P.
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1963, 16 : 23

149 - RECONDO de A.M. , FRAYSSINET C., LAFARGE C., LE BRETON E.
C.R. Acad. Sc. 1965, 261 : 1409

150 - RESEARCH To day 1949, 5 - Edited by Eli Lilly and Co -
Indianapolis - U.S.A.

151 - RICHIR C.L., TOURY J., GIORGI R., DUPIN H.
Path. Biol. 1964, 12 (19-20) : 980

152 - RIVIERE R., PAYOT J.,
Sympos. C.R.C.N.R. Villejuif 1966 : 31-40

153 - ROTH J.S.
Nature 1964, 202 : 182

154 - RUCKER R.R., YASUTAKE W.T., WOLF H.
Prog. Fish. Cult. 1961, 23 : 3

155 - SARGEANT K., O'KELLY J., CARNAGHAN R.B.A., ALLCROFT R.
Vet. Rec. 1961, 73 : 1219

156 - SARGEANT K., CARNAGHAN R.B.A., ALLCROFT R.
Chem. and Ind. 1963, 2 : 53

157 - SARGEANT K., SHERIDAN A., O'KELLY J., CARNAGHAN R.B.A.
Nature 1961, 192 : 1096

158 - SCHOENTAL R.
Brit. J. Cancer. 1961, 15 : 812

159 - SHIBKOS S., TAPPEL L.
Archs. Biochem. Biophys. 1964, 106 : 259

160 - SHNITKA T.K., SELIGMAN A.M.
J. Histochem. Cytochem. 1961, 9 : 504

161 - SILBER R.H., PORTER C.C.
J. Biol. Chem. 1954, 210 : 923

162 - SMITH R.H., Mc KERNAN W.
Nature 1962, 195 : 1301

163 - SPORN M.B., DINGMAN C.W., LANGACRE PHELPS H., WOGAN G.N.
Science 1966, 151 : 1539

164 - GRABOWK H., KOLLMANN A.
Phytiatr. Phytopharm. 1965, 14 : 73

165 - STANISLAWSKI - BIRENCWAJG M.
C.R. Acad. Sc. Paris 1965, 260 : 364

166 - STANISLAWSKI - BIRENCWAJG M.
1ère thèse - Association d'antigènes embryonnaires avec l'hépatome et d'autres lésions hépatiques chez le rat - Faculté des Sciences de l'Université de Paris - 17 Nov. 1966

167 - STAVITSKY A.B.
J. Immunol. 1954, 72 : 360

168 - STAVITSKY A.B.
J. Immunol. 1954, 72 : 368

169 - STAVITSKY A.B. , ARQUILLA E.R.
J. Immunol. 1955, 74 : 306

170 - STAVITSKY A.B., ARQUILLA E.R.
Internat. Arch. Allergy 1958, 13 : 1

171 - STEVENS A.J.
Vet. Rec. 1960, 72 : 627

172 - STREZLECK S., KOGAN L.
J. Assoc. off Anal Chem. 1966, 49 : 33

173 - SVOBODA D., GRADY H., HIGGINSON J.
The American Journal of Pathology 1966, 49 : 1023

174 - SWAR BUCK O.
Vet. Rec. 1960, 72 : 671

175 - TATSUNO T., TSUKIOKA M., SAKAI Y., SUZUKI Y., ASAMI Y.
Pharm. Bull (Japan) 1955, 3 : 476

176 - THEODOSSIADES G.
Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1963, 16 : 229

177 - TRAGER W.T., STOLOFF L., CAMPBELL A.D.
J. Ass. off. Agric. Chem 1964, 47 : 993

178 - Tropical Products Institute - Central Veterinary Laboratory - Weybridge, London 1962, Report n° 25-62 : 1-8

179 - Tropical Products Institute - Central Veterinary Laboratory - Weybridge, London 1962, Report n° 30-62 - 8 p

180 - Tropical Products Institute - Report 36/62 - 1962

181 - Tropical Products Institute-London W.C.1. 1964 - Annual report.p : 18 (ronéotypé)

182 - TOURY J., GIORGI R.
Ann. Nutrit. Alim. 1966, 20 : 111

183 - TOURY J.
Rapport O.R.A.N.A. Juin 1966

184 - UNDERHAY E., HOLT S.J., BEAUFAY H., DE DUWE C.
J. biophys. Biochem. Cytol. 1956, 2 : 635

185 - URIEL J., GRABAR P.
Ann. Inst. Pasteur. 1956, 90 : 429

186 - URIEL J.,
N.Y. Acad. Sc. 1963, 103 : 956

187 - URIEL J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1966, 48 : 969

188 - URUGACHI K., TATSUNO T., SAKAI Y., TSUKIOKA M., SAKAI Y., YONEMITSU O., ITO H., MIYAKE M., SAITO M., ENOMOTO M., SHIKATA T., ISHIKO T.
Japan S. Exp. Med. 1961, 31 : 19

189 - VERRETT M.J., MARLIAE J.P., Mc LAUGHLIN J.Jr
J. Assoc off Agric. Chem. 1964, 47 : 1003

190 - VISVANATHA RAO V.N., VALMIKINATHAN K.
Bioch. Biophys. Acta. 1968, 165 : 288

191 - WANNOP C.C.
Vet. Rec. 1960, 72 : 671

192 - WEDGWOOD P., COOPER R.L.
Analyst 1960, 78 : 170; 79 : 163

193 - WEIR D.M.
Lancet - 1961, 1 : 1147

194 - WEIR D.M.
Immunology - 1963, 6 : 581

195 - WILSON B.J., WILSON C.H.
J. Bacteriol - 1962, 83 : 693

196 - WILSON B.J., WILSON C.H.
Science - 1964, 144 : 177

197 - WILSON B.J., HARRIS T.M., HAYES A.W.
J. Bacteriol - 1967, 94 : 1738

198 - WOLF H., JACKSON E.W.
Science - 1963, 142 : 676

199 - WOOD E.M.
Prog. Fish Cult - 1956, 18 : 135

200 - WOOD E.M., LARSON C.P.
Arch. Path. - 1961, 71 : 471